

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 422**

51 Int. Cl.:

C08L 71/02	(2006.01) G01N 33/84	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01) A61K 47/10	(2007.01)
A61K 47/20	(2006.01) A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01) G01N 33/68	(2006.01)
A61K 47/32	(2006.01) A61K 47/36	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01) B01J 13/04	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	
B01J 13/02	(2006.01)	
C08L 53/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2018 PCT/IB2018/056887**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2019 WO19053578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2018 E 18779045 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3668927**

54 Título: **Polimerosomas con gradiente de pH transmembrana para la cuantificación de amoniaco en fluidos corporales**

30 Prioridad:
12.09.2017 US 201762557256 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2024

73 Titular/es:
**ETH ZURICH (100.0%)
ETH Transfer, Raemistrasse 101
8092 Zürich, CH**

72 Inventor/es:
**LEROUX, JEAN-CHRISTOPHE;
MATOORI, SIMON y
WUERTHINGER, OLHA VOZNYUK**

74 Agente/Representante:
FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 977 422 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polimerosomas con gradiente de pH transmembrana para la cuantificación de amoníaco en fluidos corporales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la composición y uso de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana para cuantificar el amoníaco en fluidos corporales (por ejemplo, suero, plasma y saliva). Más específicamente, la presente invención se ocupa de cuantificar esta molécula para, por ejemplo, diagnosticar y monitorear enfermedades o afecciones tales como la encefalopatía hepática.

Antecedentes de la invención

El amoníaco (NH_3) es un metabolito endógeno neurotóxico que se acumula en pacientes que padecen diversas enfermedades y afecciones (por ejemplo, deterioro de la función hepática (por ejemplo, debido a cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, derivación portosistémica, errores congénitos del metabolismo del amoníaco) (Matoori y Leroux ADDR 2015; 90:55-68)) o se someten a ciertos tratamientos. El amoníaco también puede acumularse en otros entornos, tal como el suelo y las aguas residuales.

20 Amoníaco en los fluidos corporales

Los niveles elevados de amoníaco en sangre (hiperamoniemia) se asocian con la encefalopatía hepática (HE), una afección neuropsiquiátrica grave con manifestaciones agudas y crónicas que pueden resultar en la muerte (Vilstrup y otros, Hepatology 2014; 60:715-735). La prevalencia de la HE en pacientes cirróticos es alta (hasta un 20 %) (Vilstrup y otros, supra; Blachier y otros, Journal of Hepatology 2013; 58:593-608). Este trastorno crónico generalmente progresa desde síntomas de baja intensidad (deterioro cognitivo) hasta síntomas graves (coma hiperamoniémico, en algunos pacientes con resultado letal) (Vilstrup y otros, supra). El valor de corte de amoníaco plasmático es de 50 μM para adultos y 100 μM para lactantes (Matoori y Leroux supra). En las crisis hiperamoniémicas agudas, se informaron niveles de amoníaco en suero superiores a 1,5 mM (Bergmann y otros, Pediatrics 2014; 133: e1072-e1076).

La cuantificación de amoníaco en sangre o plasma es una parte esencial del diagnóstico inicial de la HE y en el seguimiento de los pacientes con HE. La respuesta de los pacientes con HE a las intervenciones terapéuticas (por ejemplo, terapia con lactulosa) se determina en parte en función del cambio en los niveles de amoníaco en plasma (Vilstrup y otros, supra). Además, los niveles de amoníaco en plasma también se miden en ciertos tratamientos farmacológicos que se asocian con la hiperamoniemia (por ejemplo, la terapia con ácido valproico) (Vilstrup y otros, supra).

Los niveles de amoníaco en el semen también se han asociado con la calidad del semen y la fertilidad reducida (Kim y otros, 1998).

Los niveles de amoníaco salival están principalmente influenciados por la degradación mediada por ureasa de la urea a amoníaco en la cavidad oral, y por lo tanto podrían ser un parámetro sustituto de la urea plasmática. La cuantificación del amoníaco oral se utilizó, por ejemplo, en pacientes que padecen enfermedad renal crónica porque los niveles de urea en plasma son un marcador del éxito de la hemodiálisis, lo que permite a los cuidadores determinar cuándo se puede finalizar la sesión de diálisis (Hibbard y otros, Anal Chem 2013; 85: 12158-12165). Dado que las concentraciones de amoníaco salival son comparativamente altas (aproximadamente 1 - 8 mM, Chen y otros, J Breath Res. 2014; 8:036003, Figura 5), no pueden ser evaluadas mediante los métodos establecidos de cuantificación de amoníaco sin dilución previa. Actualmente, las mediciones de amoníaco en muchos fluidos corporales son un reto. Además de la necesidad de almacenar las muestras a bajas temperaturas para evitar los procesos de degradación generadores de amoníaco en la muestra, los métodos disponibles para la cuantificación de amoníaco tienen limitaciones importantes (Barsotti, The Journal of Pediatrics 2001; 138: S11-S20). La reacción de Berthelot, que se basa en la reacción formadora de indofenol de fenol, amoníaco e hipoclorito, está fuertemente influenciada por las aminas primarias (por ejemplo, aminoácidos, proteínas) debido a su baja selectividad (Figura 1), lo cual dificulta su uso en fluidos biológicos. En el ensayo de amoníaco basado en enzimas (por ejemplo, ensayo de amoníaco Randox AM1015, Randox Laboratories Ltd, Schwyz, Suiza), la glutamato deshidrogenasa convierte el amoníaco y el alfa-cetoglutarato en L-glutamato y agua mediante la oxidación estequiométrica de NAD(P)H a NAD(P)^+ . Debido a los diferentes espectros de absorbancia de NAD(P)H y NAD(P)^+ , la reacción puede seguirse espectrofotométricamente, y la concentración de amoníaco puede determinarse. El límite superior de cuantificación de la mayoría de los ensayos comerciales basados en la glutamato deshidrogenasa es de aproximadamente 1,2 mM. Desafortunadamente, el método de cuantificación enzimática de amoníaco se ve influenciado por una variedad de factores (por ejemplo, lípidos, metales pesados tales como el zinc o el hierro, enzimas que reaccionan con NAD(P)H o NAD(P)^+ , taninos) y depende del tiempo exacto para producir resultados confiables debido a la fuerte dependencia temporal de la reacción enzimática (Seiden-Long y otros, Clinical Biochemistry 2014; 47:1116-1120). Esto complica los experimentos de alto rendimiento. El analizador de amoníaco en sangre PocketChem™ BA es un sistema basado en tiras para análisis de amoníaco en sangre capilar en el punto de atención. Cuando la muestra

penetra en la tira, se alcaliniza, lo que convierte el amonio en amoniaco. El amoniaco posteriormente atraviesa una membrana hidrofóbica y provoca un cambio de pH en una tira indicadora, el cual que se cuantifica espectrofotométricamente. El medidor de amoniaco en sangre PocketChem™ BA PA-4140 no se utiliza ampliamente en estudios preclínicos y clínicos debido a sus sesgos constantes y proporcionales negativos, baja capacidad de procesamiento (3 minutos por medición) y bajo límite superior de cuantificación (0,285 mM) (Goggs y otros, Veterinary Clinical Pathology 2008; 37:198-206).

Ziyuan Song y otros describen en el documento: "Preparation of Surfactant-Resistant Polymersomes with Ultrathick Membranes through RAFT Dispersion Polymerization" (ACS Applied Materials & Interfaces, vol. 8, núm. 27, 13 de julio de 2016 (13-07-2016), páginas 17033-17037) polimerosomas resistentes a surfactantes con membranas ultragrasas fabricadas a partir de copolímeros de bloques PEO113-b-PSt1441 (óxido de polietileno-poliestireno) que encapsulan Rodamina B. La liberación de activos de estos polimerosomas fue menor que el 7 % después de un mes de incubación con hasta un 40 % en peso de varios surfactantes aniónicos y no iónicos. El documento WO 2015/031911 A1 describe un biosensor que comprende: un primer y segundo recipiente; una abertura de intercambio de fluidos posicionada entre el primer y el segundo recipiente; un conducto en comunicación fluida con el primer recipiente, el conducto configurado para recibir un fluido desde un punto externo hasta el biosensor; y una membrana posicionada en la abertura de intercambio de fluidos; en donde la membrana comprende un ionómero tal como Nation que se ha pretratado con una solución ácida.

Otras muestras

El amoniaco es un contaminante frecuente del suelo y el agua (debido, por ejemplo, a fertilizantes que contienen amoniaco o residuos industriales (Mook y otros, Desalination 2012; 285:1-13). Generalmente se cuantifica utilizando electrodos selectivos de iones de amonio (Mook y otros, supra). Sin embargo, cationes con la misma carga y un radio iónico similar (por ejemplo, potasio) podrían interferir con las mediciones de electrodos selectivos de iones.

Existe la necesidad de herramientas alternativas de cuantificación para el amoniaco en muestras que incluyen fluidos corporales.

Resumen de la invención

Esta invención describe la composición y uso de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana para cuantificar (por ejemplo, determinar la concentración de) amoniaco en fluidos corporales. Utiliza, por ejemplo, polimerosomas compuestos por copolímeros de bloque anfífilicos (por ejemplo, poli(estireno)-b-poli(óxido de etileno) (PS-b-PEO, también conocido como poli(estireno)-b-poli(etilenglicol), PS-b-PEG)). Más específicamente, la invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

El aumento del pH en el núcleo del polimerosoma resultante de la captura de amoniaco se cuantifica utilizando un tinte sensible al pH (por ejemplo, piranina (sal trisódica de 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, es decir, sal trisódica de HPTS), conjugado de dextrano Lyosensor™ Amarillo/Azul, sal disódica de 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfonato (ANTS), carboxilato IRDye™ 680RD, etc.).

Polimerosomas compuestos por el copolímero de bloque anfífilico de poli(estireno)-b-poli(etilenglicol) (PS-b-PEO) y un componente ácido (ver, por ejemplo, la solicitud PCT en trámite núm.: PCT/IB2017/054966 presentada el 15 de agosto de 2017) se utilizaron para medir la concentración de amoniaco en los fluidos corporales. Para preparar los polimerosomas, se utilizó un solvente orgánico. El polímero se disolvió en un solvente apropiado (por ejemplo, diclorometano) y se emulsionó en una solución ácida (por ejemplo, ácido cítrico) o una solución de cloruro de sodio que contenía un tinte sensible al pH. Después de la eliminación del solvente, los polimerosomas se purificaron para eliminar el tinte no encapsulado y, en caso de haberlos, otros ácidos débiles. Los polimerosomas mostraron sus propiedades de absorción hacia el amoniaco una vez expuestos a una solución de pH neutro o alto. La eficacia de los polimerosomas se demostró aquí al mostrar la cuantificación de amoniaco en un tampón, así como en suero, plasma, saliva, orina, sudor y semen nativos y enriquecidos (Figuras 3-5 y 7-9).

Los polimerosomas de la presente invención pueden utilizarse para la cuantificación de amoniaco (o, indirectamente, de otros biomarcadores que pueden transformarse *in vitro* en una cantidad correspondiente (factor de 1 o más) de amoniaco (por ejemplo, aminoácidos tales como la fenilalanina)). En modalidades más específicas, pueden utilizarse para analizar los fluidos corporales para el diagnóstico de enfermedades o trastornos asociados con el amoniaco (por ejemplo, hiperamonemia), seguimiento de pacientes con una enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco, y para el uso preclínico y en la investigación. El producto diagnóstico de la presente invención puede utilizarse en estudios *in vitro*, preclínicos (por ejemplo, estudios en animales) y clínicos que requieran la cuantificación de amoniaco, así como en mediciones de amoniaco en la práctica clínica de rutina. Las mediciones de amoniaco se pueden utilizar para el diagnóstico y estadificación de enfermedades o trastornos relacionados con el amoniaco, así como para evaluar la respuesta de un paciente hiperamonémico a un tratamiento contra la hiperamonemia o la respuesta de un paciente en riesgo de hiperamonemia a una medida preventiva. La presente invención también puede utilizarse para cuantificar el amoniaco en ensayos *in vitro*, más específicamente para identificar compuestos que inhiben la producción de amoniaco.

Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana de la presente invención pueden mostrar ventajosamente una alta selectividad hacia el amoníaco (Figura 6) - presumiblemente, pero sin limitarse a esta hipótesis, debido a la naturaleza impermeable de la membrana de poliestireno altamente hidrofóbica - y un amplio rango de detección de al menos aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 8 mM (Figuras 2 y 13). Un límite superior de cuantificación alto sería ventajoso ya que al menos reduciría (e incluso podría eliminar) la necesidad de diluir muestras concentradas de amoníaco.

Además, la cinética de absorción de amoníaco en los polimerosomas es rápida e independiente del tiempo (baja dependencia del tiempo) después de 2,5 minutos de incubación a pH fisiológico (Figura 2). Estas características permiten el análisis de un alto número de muestras al mismo tiempo.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención se harán más evidentes al leer la siguiente descripción no restrictiva de sus modalidades específicas, proporcionadas únicamente a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

en las figuras adjuntas:

La Figura 1 muestra el efecto de la L-lisina en la cuantificación de amoníaco basada en la reacción de Berthelot. La presencia de L-lisina conduce a una subestimación de la concentración de amoníaco utilizando la reacción de Berthelot. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 2 muestra la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana de PS-b-PEO que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato. La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-b-PEO que contienen piranina es una función de la concentración de amoníaco en el medio. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 3 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en suero humano. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en suero humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3 para el ensayo de polimerosomas y n=8 para el kit enzimático).

La Figura 4 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en plasma humano. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en plasma humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 5 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en saliva humana. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en la saliva humana nativa y enriquecida de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 6 muestra el efecto de la L-lisina en la cuantificación de amoníaco basada en polimerosomas de PS-b-PEO. La presencia de hasta 15 mM de L-lisina (es decir, 100 veces la concentración plasmática normal) no influye en la concentración de amoníaco medida. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 7 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en orina humana. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en la orina humana nativa y enriquecida de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 8 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en el sudor humano. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en el sudor humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 9 compara la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO fluorescentes y mediante un ensayo comercial enzimático de amoníaco en semen humano. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en semen humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 10 muestra la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugados con dextrano en diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato. La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-b-PEO que contienen Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugados con dextrano es una función de la concentración de amoníaco en el medio. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 11 muestra la relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-b-PEO que contienen ANTS a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato. La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-b-PEO que contienen ANTS es una función de la concentración de amoníaco en el medio. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 12 muestra la intensidad de fluorescencia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen IRDye™ 680RD a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato. La intensidad de fluorescencia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen IRDye™ 680RD es una función de la concentración de amoníaco en el medio. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 13 muestra la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato, en ausencia de un ácido adicional en el núcleo del polimerosoma. La relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen piranina en ausencia de un ácido adicional en el núcleo del polimerosoma es una función de la concentración de amoníaco en el medio. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 14 muestra la cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-b-PEO que contienen piranina (relaciones PS/PEO de aproximadamente 1,2 y aproximadamente 3) en tampón fosfato. Los polimerosomas de PS-b-PEO con gradiente de pH transmembrana y que contienen piranina (relación PS/PEO de aproximadamente 1,2 y 3,0) fueron capaces de cuantificar amoníaco en tampón fosfato. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

La Figura 15 muestra la relación de absorbancia de polimerosomas de PS-b-PEO que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato. Los resultados se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Descripción de modalidades ilustrativas

La presente invención incluye polimerosomas con gradiente de pH transmembrana para cuantificar amoníaco en fluidos corporales, composiciones que comprenden los polimerosomas, procesos para fabricar los polimerosomas y el uso de estos polimerosomas y composiciones.

Polimerosomas

Los polimerosomas son vesículas, cuya membrana en bicapa se ensambla a partir de copolímeros sintéticos. Tienen diámetros medios que varían de 50 nm a 100 µm o más, en una modalidad específica, que varían de 100 nm a 40 µm, según se determina mediante difracción láser. Aunque los polimerosomas analizados de la presente invención, que tienen diámetros medios que varían de 100 nm a 40 µm, fueron capaces de encapsular eficazmente el amoníaco, no hay motivo para creer que los polimerosomas con un diámetro mayor que 40 µm no puedan ser igualmente eficaces.

Los polimerosomas de la presente invención comprenden copolímeros de bloque anfífilicos y se preparan utilizando un solvente orgánico.

El mecanismo de acción de la presente invención se basa en el gradiente de pH a través de la membrana de los polimerosomas. El agente ácido contenido en el núcleo acuoso del polimerosoma posee un pH diferente (inferior) al pH de la muestra (por ejemplo, pH fisiológico), o al pH de la muestra después de la adición de un tampón, en varias muestras de fluidos (por ejemplo, muestras de fluidos corporales) utilizadas para la presente invención. Típicamente, la sangre humana y sus fracciones líquidas tienen un pH entre 7,35 y 7,45; la saliva tiene un pH entre 6,7 y 7,4 (Baliga y otros J Indian Soc Periodontol. 2013; 17:461-465); la orina tiene un pH entre 4,5 y 7,5 (Maalouf y otros, Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2007; 2:883-888); el sudor tiene un pH entre 4,5 y 7 (Oncescu y otros, Lab Chip 2013; 13:3232-3238); y el semen tiene un pH entre 7,2 y 8,0 (Haugen y otros, International Journal of Andrology 1998;21:105-108). Tales rangos son similares en otros mamíferos. Por lo tanto, el amoníaco puede difundir a través de la membrana polimérica hidrofóbica de los polimerosomas en su estado sin carga y luego quedar atrapado en su estado protonado (ionizado) (por ejemplo, amonio en el caso del amoníaco) en el compartimento interno. Aunque el amoníaco existe principalmente en su estado protonado en el pH de las muestras (por ejemplo, fluidos corporales), ya sea utilizado tal cual o diluido con un tampón, siempre hay una pequeña fracción de amoníaco en su estado no ionizado. Esta fracción puede difundir en los polimerosomas y quedar atrapada en su estado protonado dentro de los polimerosomas. La protonación de la molécula de amoníaco consume un protón que aumenta el pH dentro del núcleo del polimerosoma. El equilibrio amoníaco/amonio se restablece rápidamente en la fase exterior (es decir, la desprotonación del amonio para restablecer la fracción de amoníaco), lo que produce más moléculas de amoníaco que pueden difundir al núcleo del polimerosoma. La propiedad espectroscópica (intensidad de fluorescencia o absorbancia) a una longitud de onda dependiente del pH del tinte sensible al pH dentro del núcleo del polimerosoma cambia con el aumento de la concentración de amoníaco en el núcleo.

Como se utiliza en el presente documento, la propiedad "gradiente de pH transmembrana para cuantificar amoníaco" se refiere a la capacidad de los polimerosomas de la presente invención para secuestrar amoníaco cuando se diluyen en una muestra (por ejemplo, una muestra de fluido corporal) (que a su vez puede haberse diluido en un tampón).

Copolímeros de bloques

Los "polímeros" son macromoléculas que comprenden unidades monoméricas conectadas. Las unidades monoméricas pueden ser de un solo tipo (homopolímero) o de una variedad de tipos (copolímero). Un copolímero hecho de una secuencia de dos o más monómeros de un solo tipo (un bloque) unidos covalentemente a dos o más monómeros de otro tipo (otro bloque) se denomina copolímero de bloques. Un copolímero hecho de dos tipos de bloques unidos covalentemente se denomina dibloque, de tres tipos de bloques se denomina tribloque, etc. Los copolímeros de bloques pueden comprender, como resultado de la síntesis específica utilizada para generarlos, diferentes grupos terminales.

Los polimerosomas de la presente invención comprenden copolímeros de bloques. En una modalidad específica, los copolímeros de bloques de la presente invención son copolímeros dibloque o tribloque. Estos copolímeros de bloques son anfifílicos y están formados por al menos dos polímeros, específicamente, un polímero aromático altamente hidrofóbico (por ejemplo, poli(estireno)) y un polímero hidrofílico sin carga y no biodegradable. En una modalidad más específica, el copolímero de bloques es un copolímero dibloque (por ejemplo, poli(estireno)-*b*-poli(óxido de etileno) (PS-*b*-PEO)), o un copolímero tribloque (por ejemplo, PEO-*b*-PS-*b*-PEO)) (es decir, copolímeros de bloques PS PEO)).

Un copolímero "anfifílico" es aquel que contiene tanto grupos hidrofílicos (solubles en agua) como hidrofóbicos (insolubles en agua).

Como se utiliza en el presente documento, el término "no biodegradable" significa no hidrolizable en condiciones de muestras de fluidos (por ejemplo, muestras de fluidos corporales) (por ejemplo, resistente a la degradación a través del pH, enzimas u otros medios).

Polímero hidrofóbico sin carga

en una modalidad específica, el polímero hidrofóbico sin carga utilizado en los copolímeros de la presente invención es un poli(etileno) $-(CH_2-CH(C_2H_5))_n-$, es decir, $-(C_4H_8)_n-$ o un poli(estireno) $-(CH_2-CH(Ph))_n-$, es decir, $-(CH_2-CH(C_6H_5))_n-$ o $-(C_8H_8)_n-$. En modalidades específicas, el polímero hidrofóbico sin carga es un poli(estireno) (PS). Los poli(estirenos) para su uso en la presente invención pueden incluir monómeros de estireno no sustituidos y/o sustituidos/funcionalizados. A menos que se defina específicamente de otra manera, el término "poli(estireno)" se utiliza en el presente documento de manera genérica para designar un poli(estireno) que comprende exclusivamente monómeros de estireno no sustituidos, una mezcla de monómeros de estireno sustituidos y no sustituidos, o exclusivamente monómeros de estireno sustituidos. Los uno o más sustituyentes en el monómero de estireno pueden incluir sustituyentes en el fenilo y/o en el carbono al que está unido el fenilo y/o pueden formar derivados policíclicos con el fenilo (por ejemplo, bicíclos, tricíclos, etc. que comprenden arilo(s) C3-C6 y/o cicloalquilo(s) C3-C6). Los posibles sustituyentes incluyen alquilo (C1 a C7 (C1, C2, C3, C4, C5, C6 o C7, más específicamente C1, C2 o C3), arilo (C3-C6), cicloalquilo C3-C8, aril-alquilo, acetoxilo, alcoxilo (metoxilo, etoxilo, propanoxilo, butoxilo, etc.), halógeno (Br, Cl, F, etc.), amina, amida, alquilamina, NO₂. Los sustituyentes pueden ser ellos mismos sustituidos. Sin limitarse a ello, el monómero de estireno sustituido incluye acetoxiestireno, bencidriestireno, benciloxi-metoxiestireno, bromoestireno (2-, 3-, 4- o alfa), cloroestireno (2-, 3-, 4- o alfa), fluoroestireno (2-, 3-, 4- o alfa), terc-butoxiestireno, terc-butilestireno, cloro-metilestireno, difluoroestireno, dimetoxiestireno, dimetilestireno, dimetilvinilbencilamina, difenil metil penteno, (difenilfosfina)estireno, etoxiestireno, isopropenilnilina, isocianato de isopropenil-a-dimetilbencilo, [N-(metilaminoetil)aminometil]estireno, metilestireno, nitroestireno, 4-vinilbenzoato de pentafluorofenilo, pentafluorostireno, (trifluormetil)estireno (2-, 3- o 4-), trimetilestireno, vinilnilina (3- o 4-), vinilnilisol, ácido vinilbenzoico (3- o 4-), cloruro de vinilbencilo, (vinilbencil)trimetilamonio, vinilbifenilo, 4-vinilbenciclobuteno (4-, etc.), vinilantraceno (9-, etc.), 2-vinilnaftaleno, vinilbifenilo (3-, 4-, etc.), etc. En una modalidad, el PS comprende al menos un monómero de estireno sustituido. Los sustituyentes pueden ser grupos no iónicos (por ejemplo, grupos metilo o terc-butilo). En modalidades particulares, el monómero de estireno sustituido es un alquilestireno (por ejemplo, metilestireno) o un terc-butilestireno. En otra modalidad específica, los monómeros de estireno en el poli(estireno) son no sustituidos.

Polímero hidrofílico sin carga

El polímero hidrofílico sin carga que puede utilizarse con poli(estireno) en el copolímero de bloques de la presente invención incluye poli(óxido de etileno), poli(vinilpirrolidona), poli(etiloxazolina), poli(metiloxazolina) y polímeros de acrilato de alquil oligoetilenglicol. En modalidades específicas, el polímero hidrofílico sin carga es óxido de polietileno.

El óxido de polietileno (PEO) para su uso en la presente invención tiene la fórmula general: $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, es decir, $-(C_2H_4O)_n-$ e incluye monómeros de óxido de etileno no sustituidos y sustituidos/funcionalizados. A menos que se defina específicamente lo contrario, el término "poli(óxido de etileno)" o PEO se utiliza en el presente documento de manera genérica para designar un PEO que comprende exclusivamente monómeros de óxido de etileno no sustituidos, una mezcla de monómeros de óxido de etileno sustituidos y no sustituidos, o exclusivamente monómeros de óxido de etileno sustituidos. En una modalidad, el PEO comprende al menos un monómero de óxido

de etileno sustituido. En otra modalidad, los monómeros de óxido de etileno son no sustituidos.

Proporción de polímeros

5 Los pesos moleculares de los bloques de PS y PEO (por ejemplo, el dibloque PS-b-PEO o el tribloque PEO-b-PS-b-PEO) pueden variarse siempre y cuando se conserve la estructura y estabilidad de la bicapa. Los inventores encontraron que los polimerosomas estables de PS-b-PEO se forman cuando la relación de peso molecular promedio de PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4 (ver, por ejemplo, los Ej. 2-16). En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 4. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 4. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 4. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,9 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,9. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,9. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,9. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,8 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,8. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,8. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,8. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y menor que 3,8. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,7 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,7. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,7. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,7. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,6 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,6. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,6. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,6. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,5 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,5. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,5. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,5. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,4 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,4. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,4. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,4. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,3 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,3. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,3. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,3. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,2 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,2. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,2. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,2. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 3,2 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3,1. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3,1. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3,1. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y menor que 3,1. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y menor que 3. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y menor que 3. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y menor que 3. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,9 o menor. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y aproximadamente 2,9 o menor. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y aproximadamente 2,9 o menor. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,9 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,8 o menor. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,1 o mayor y aproximadamente 2,8 o menor. En otra modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,2 o mayor y aproximadamente 2,8 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,7 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,7 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,7 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,7 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,7 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,6 o menor. En otra modalidad específica, la

relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,6 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,6 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,6 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,6 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,5 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,5 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,5 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,5 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,5 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,4 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,4 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,4 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,4 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,4 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,3 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,3 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,3 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,3 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,3 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,2 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,2 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,2 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,2 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,2 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,1 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,1 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,1 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,1 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,1 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que 1 y aproximadamente 2,0 o menor. En otra modalidad específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,0 o menor. En una modalidad específica, la relación es entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,0 o menos. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,3 o mayor y aproximadamente 2,0 o menor. En una modalidad específica, la relación es aproximadamente 1,4 o mayor y aproximadamente 2,0 o menor.

Sin limitar la generalidad de las afirmaciones anteriores, los PEO que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 400 g/mol hasta 20 000 g/mol se incluyen en la presente invención. Sin embargo, los solicitantes no tienen motivo para esperar que PEO de mayor peso molecular no puedan utilizarse eficazmente en las presentes invenciones. Los polímeros de menor peso molecular pueden ser más fáciles de manipular. Típicamente, el peso molecular del PEO está entre 1000 y 5000 g/mol. El peso molecular del PS se selecciona para satisfacer la relación descrita anteriormente. De acuerdo con la presente invención, cuando el PEO tiene un peso molecular de aproximadamente, por ejemplo, 20 000 g/mol, el peso molecular del PS es menor que aproximadamente 80 000 g/mol.

Propiedades de los polimerosomas fabricados a partir de un polímero hidrofóbico sin carga + un polímero hidrofílico sin carga (copolímeros di- o tribloque (por ejemplo, copolímeros PS-*b*-PEO o copolímeros PEO-*b*-PS-*b*-PEO))

Sin limitarse a esta hipótesis, se cree que la interacción fuerte del polímero altamente hidrofóbico (por ejemplo, aromático (por ejemplo, PS) con la capacidad de realizar interacciones de apilamiento π) en la membrana de la vesícula proporciona resistencia contra muestras de fluido (por ejemplo, muestras de fluidos corporales tales como suero, plasma y saliva) y proporciona selectividad al amoníaco (es decir, permeabilidad selectiva al amoníaco y baja permeabilidad a la mayoría de los otros compuestos biológicos) como se demuestra por la capacidad de cuantificación de amoníaco retenido de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana en diferentes entornos biológicos complejos y en exceso de la amina primaria L-lisina (ver los Ej. 3-9). En modalidades específicas, los bloques de polímero en el polimerosoma son no biodegradables.

Método de preparación de polimerosomas

Preparación de copolímero

Se puede utilizar cualquier método conocido para la fabricación de copolímeros. Los copolímeros utilizados en los Ejemplos descritos en el presente documento se adquirieron en Advanced Polymer Materials Inc (Dorval, Canadá) (PS-*b*-PEO) (ver los Ej. 2-11, 14) o se sintetizaron (ver los Ej. 12-16).

Preparación de polimerosomas

El copolímero se disuelve en un solvente orgánico para formar una fase orgánica, y esta última se mezcla con la solución ácida acuosa (por ejemplo, un tinte sensible al pH, y opcionalmente, si la concentración del tinte sensible al

pH no es suficientemente alta, un ácido adicional, por ejemplo, el ácido cítrico (fase acuosa). El paso de mezcla puede realizarse a través de diferentes técnicas. Por ejemplo, puede utilizarse una emulsión de aceite en agua (ac/a) (es decir, una fase de solvente orgánico que contiene polímero (es decir, fase oleosa) en una solución acuosa ácida (es decir, fase acuosa)), una evaporación de fase inversa, una nanoprecipitación o un método de doble emulsión para mezclar la fase orgánica que contiene polímero y la fase acuosa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tinte sensible al pH" se refiere en el presente documento a un tinte cuyas propiedades espectroscópicas dependen del pH del medio. En particular, incluye un tinte de absorbancia sensible al pH y un tinte fluorescente sensible al pH. Como el método de la presente invención se basa en medir cambios de pH en el núcleo del polimerosoma, todos los tintes sensibles al pH se incluyen en la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tinte de absorbancia" se refiere a un tinte que absorbe ciertas longitudes de onda del ultravioleta, visible y/o infrarrojo cercano cuando se irradian con ellas. Como se utiliza en el presente documento, el término "tinte de absorbancia sensible al pH" se refiere a un tinte cuyo espectro de absorbancia varía en función del pH en el medio. Sin limitarse a ello, los tintes de absorbancia sensibles al pH de la presente invención incluyen HPTS o una sal del mismo (por ejemplo, sal potásica o trisódica de HPTS), tintes de triarilmetano (por ejemplo, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, rojo cresol, rojo clorofenol, rojo fenol, fenoltaleína, verde malaquita, azul de timol, azul de bromotimol), tintes azoicos (por ejemplo, naranja de metilo, rojo de metilo, eriocromo negro T, rojo Congo), tintes de nitrofenol (por ejemplo, 2,4-dinitrofenol), tintes de antraquinona (por ejemplo, alizarina) y los tintes enumerados a continuación bajo "tinte fluorescente sensible al pH".

El tinte de absorbancia sensible al pH puede comprender además al menos una longitud de onda independiente del pH (isobéctica), cuyo valor de absorbancia es independiente del pH y puede utilizarse para normalizar el valor de absorbancia a la longitud de onda dependiente del pH. El tinte de absorbancia sensible al pH puede normalizarse además a un valor de absorbancia en otra longitud de onda dependiente del pH (ver el Ej. 16).

Como se utiliza en el presente documento, el término "tinte fluorescente" se refiere a un tinte que, cuando se irradia a ciertas longitudes de onda del ultravioleta, visible y/o infrarrojo cercano, genera una intensidad de fluorescencia que produce o altera la intensidad de fluorescencia de la solución en la que el tinte se disuelve a una concentración adecuada. Como se utiliza en el presente documento, el término "tinte fluorescente sensible al pH" se refiere a un tinte fluorescente que comprende al menos una longitud de onda (de excitación o emisión) dependiente del pH.

El tinte fluorescente sensible al pH puede comprender además al menos una longitud de onda (de excitación o emisión) independiente del pH (isobéctica), cuya intensidad de fluorescencia es independiente del pH y puede utilizarse para normalizar la intensidad de fluorescencia en la longitud de onda dependiente del pH (de excitación o emisión). Sin limitarse a ello, los tintes fluorescentes sensibles al pH de la presente invención incluyen hidroxipireno y sus derivados tales como HPTS o una sal del mismo (por ejemplo, sal tripotásica o trisódica de HPTS), fenilpiridiloxazol y sus derivados tales como Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano, derivados de naftaleno (por ejemplo, aminonaftaleno y sus derivados tales como ANTS o una sal del mismo (por ejemplo, sal disódica o dipotásica), cianina y sus derivados tales como IRDye™ 680RD, derivados de xanteno (por ejemplo, fluoresceína y sus derivados (por ejemplo, carboxifluoresceína sódica), rodamina B y sus derivados), derivados de cumarina, derivados de escuaraina, derivados de oxadiazol, derivados de antraceno, derivados de pireno, derivados de oxazina, derivados de acridina, derivados de acridina, derivados de arilmetina, derivados de indolinio ((E)-6-hidroxi-5-sulfo-4-(2-(1,3,3-trimetil-3H-indol-1-ilo-2-il)vinil)-2,3-dihidro-1H-xanteno-7-sulfonato, yoduro de (E)-2-(2-(6-hidroxi-7-(morfolinometil)-2,4a-dihidro-1H-xanten-3-il)vinil)-3,3-dimetil-1-propil-3H-indol-1-ilo, (E)-2-(2-(7-(benzo[d]tiazol-2-il)-6-hidroxi-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)vinil)-3,3-dimetil-1-(3-sulfonatopropil)-3H-indol-1-ilo-5-sulfonato) y derivados de tetrapirrol. De nota, los tintes fluorescentes de infrarrojo cercano (NIR) tales como IRDye™ 680RD pueden utilizarse directamente para analizar muestras de fluidos corporales que contienen células, tales como sangre (es decir, sangre total) (es decir, no es necesario eliminar las células (por ejemplo, eritrocitos) de la muestra de fluido antes del ensayo de fluorescencia). Cada tinte tiene un perfil de intensidad de fluorescencia (excitación o emisión) específico dependiente del pH: el pH del núcleo del polimerosoma se adapta al rango de pH en donde el tinte es más sensible a los cambios de pH (es decir, en donde el espectro de intensidad de fluorescencia (excitación o emisión) del tinte muestra la mayor dependencia del pH). En una modalidad específica, el pH en el núcleo de polímero está entre aproximadamente 2 y 6,5. En una modalidad más específica, el pH en el núcleo del polímero está entre aproximadamente 2 y 5,5.

Se puede utilizar más de un tinte. Por ejemplo, pero sin limitarse únicamente a esto, se puede combinar un tinte fluorescente sensible al pH que comprende al menos una longitud de onda dependiente del pH, pero ninguna longitud de onda independiente del pH, con otro tinte que comprende al menos una longitud de onda independiente del pH (por ejemplo, con fines de calibración),

La concentración del tinte sensible al pH en el núcleo del polimerosoma se selecciona de manera que genere una absorbancia o intensidad de fluorescencia adecuada. En ausencia de otro ácido, el pH del núcleo del polimerosoma y la concentración del tinte ácido sensible al pH (por ejemplo, fluorescente) se selecciona para mostrar una alteración progresiva en la intensidad de fluorescencia dependiente del pH en relación con la concentración de amoníaco en el núcleo del polimerosoma. La concentración del tinte sensible al pH típicamente varía de

aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 mM. En una modalidad específica, cuando se utiliza un tinte fluorescente sensible al pH, el rango es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 mM. En los ejemplos descritos en el presente documento, varía de aproximadamente 0,01 mM (LysoSensor™ Amarillo/Azul dextrano, 10 000 MW) a aproximadamente 10 mM (piranina y ANTS). En el método de emulsión aceite en agua (ac/a), el solvente orgánico que contiene polímero se mezcla con la fase acuosa ácida (que contiene el tinte sensible al pH) bajo sonicación durante un tiempo suficiente para formar una emulsión. En los ejemplos a continuación, la fase acuosa se saturó con solvente orgánico bajo agitación durante 30 minutos antes de la adición de la fase de solvente orgánico que contiene polímero. Posteriormente, la fase de solvente orgánico que contiene polímero se añadió a la fase acuosa que contiene ácido bajo sonicación en un baño de hielo (para reducir el calor producido por el sonicador), utilizando los siguientes parámetros específicos de la máquina: amplitud 70, ciclo 0,75 (UP200H, 200 W, 24 kHz, Tecnología de Ultrasonido Hielscher con sonotrodo S1) durante 3 min o amplitud 10 (sonotrodo de 3,1 mm, Modelo 705 Sonic Dismembrator™ de Fisher Scientific, 700 W, 50/60 Hz, Fisher Scientific) durante 2 min. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para crear una emulsión. El uso de la sonicación, así como los parámetros de sonicación específicos y el tiempo adecuado para producir una emulsión, dependerá de la técnica de emulsificación utilizada. No es necesario que la emulsión sea estable en los métodos de preparación de la presente invención.

En el método de evaporación en fase inversa, se somete a sonicación un sistema bifásico que comprende un solvente orgánico que contiene polímero y un tinte sensible al pH, y, si es necesario, una fase acuosa que contiene ácido adicional, para formar una emulsión de agua en aceite (ac/a). La fase exterior se evapora bajo presión reducida hasta que se forme un estado viscoso similar a un gel. Los polimerosomas se forman cuando el estado de gel colapsa (Krack y otros, J. Am. Chem. Soc. 2008; 130:7315-7320). El solvente y el tinte no encapsulado se eliminan posteriormente.

En el método de nanoprecipitación, los polímeros se disuelven en un solvente orgánico adecuado, al cual se añade lentamente un tinte sensible al pH y, si es necesario, agua que contiene ácido adicional. Alternativamente, la fase orgánica podría añadirse a la fase acuosa. El solvente y el tinte no encapsulado se eliminan posteriormente.

En el método de doble emulsión, los polimerosomas se forman en una doble emulsión a/ac/a que contiene un tinte sensible al pH y, si es necesario, una fase interna acuosa que contiene ácido adicional, un solvente orgánico completa o parcialmente inmiscible en agua que contiene polímero en la fase intermedia y una fase exterior acuosa. El solvente y el tinte no encapsulado se eliminan posteriormente.

El pH (por ejemplo, pH neutro y básico) y la composición (sin tampón (es decir, dilución de la solución que contiene polimerosomas en soluciones fisiológicas naturalmente tamponadas tales como suero o plasma) o con tampón) en la fase exterior/externa también pueden variar. Aumentar el pH de la fase exterior promete acelerar la cinética de absorción a velocidades aún más altas debido a la mayor fracción de amoniaco en el equilibrio amoniaco/amonio.

Como se utiliza en el presente documento, el "tampón" para su uso en la fase exterior/externa de los polimerosomas y/o añadido en muestras de fluidos corporales a analizar se utiliza para estabilizar el pH o aumentarlo con el fin de desprotonar aún más el amonio en la muestra a analizar (es decir, aumentar la abundancia de amoniaco) y por lo tanto aumentar la velocidad de difusión del amoniaco en los polimerosomas. Se espera que cualquier tampón neutro o alcalino sea adecuado para la estabilización del pH y cualquier tampón alcalino sea adecuado para el aumento del pH. Sin limitarse a ello, puede ser más particularmente un tampón que contiene fosfato, borato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), imidazol, sales de hidrogenocarbonato y carbonato, o tris(hidroximetil)aminometano.

La concentración del tampón en la fase exterior o añadido a la muestra (por ejemplo, fluido corporal) a analizar se selecciona de manera que se garantice un valor de pH adecuado de la solución resultante para crear un gradiente de pH suficiente, teniendo en cuenta el pH del núcleo del polimerosoma, que depende del perfil de pH del tinte. Típicamente varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 150 mM. En una modalidad específica, es de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 mM, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 mM.

El pH del tampón en la fase exterior o del tampón añadido a la muestra (por ejemplo, fluido corporal) a analizar se selecciona de manera que proporcione un gradiente de pH suficiente entre la fase exterior y la fase interna y garantice un perfil cinético adecuado. Típicamente varía de pH 7 - 10. En una modalidad específica, es aproximadamente pH 7,4 (es decir, el pH del tampón PBS utilizado para preparar una curva estándar de amoniaco) (ver los Ej. 2-16). En otra modalidad específica, el pH de todas las muestras a analizar se ajusta para que tenga el mismo valor de pH que los estándares de amoniaco o fenilalanina para permitir comparaciones (ver los Ej. 2-16). En otra modalidad específica más, después de la adición del polimerosoma con una fase exterior tamponada a pH 7,4 a las muestras de fenilalanina a analizar a pH 8,5 y a la curva estándar de fenilalanina a pH 8,5, el pH resultante de la dispersión también se encuentra alrededor de 7,4 (ver el Ej. 15). Sin embargo, el pH de la muestra a analizar y los estándares no tienen que ser idénticos si el pH se ajusta al mezclar el estándar o la muestra con la dispersión de polimerosomas, mientras que la capacidad de tamponamiento de la fase exterior en la dispersión de polimerosomas establecería el pH, y/o con un tampón adicional que ajuste el pH de la dispersión resultante. En una modalidad específica, el pH de la fase exterior de la dispersión resultante de mezclar la dispersión de polimerosomas con la

muestra a analizar y, si es necesario, un tampón adicional, se ajusta para que sea el mismo pH que el de la fase exterior de la dispersión resultante de mezclar la dispersión de polimerosomas con los estándares de amoníaco o fenilalanina y, si es necesario, un tampón adicional, para permitir comparaciones. Sin limitarse a ello, un pH de 7,4 para analizar muestras de sangre y fracciones de sangre también es ventajoso porque, al corresponder al pH de dichas muestras, limita el riesgo de posibles artefactos dependientes del pH. Si se puede crear un gradiente de pH suficiente entre el núcleo del polimerosoma y la muestra a analizar, mediante la capacidad de tamponamiento inherente de la muestra, se puede prescindir de cualquier tampón añadido externamente a la fase exterior.

Como se utiliza en el presente documento, el término "gradiente suficiente" se entiende generalmente como una diferencia de al menos una unidad de pH, y en una modalidad preferida, al menos 1 unidad de pH, preferiblemente al menos 2 unidades de pH, entre el pH del núcleo y la muestra a analizar (por ejemplo, un pH de 6 o más en la muestra y un pH de 5 o menos en el núcleo, preferiblemente un pH de 7 o más en la muestra y un pH de 5 o menos en el núcleo). Típicamente, las muestras a analizar tienen inherentemente o se ajustan (mediante la adición de un tampón directamente o mediante la adición de polimerosomas con una fase exterior tamponada) para tener un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 10.

El solvente orgánico utilizado en el proceso de preparación se elimina de los polimerosomas utilizando cualquier técnica conocida. Sin estar tan limitada, puede utilizarse una aplicación de presión inferior al ambiente, calor, filtración, filtración de flujo cruzado, diálisis o una combinación de estos métodos para eliminar el solvente.

Después de la eliminación del solvente orgánico, los polimerosomas se purifican para disminuir la cantidad de tinte sensible al pH no encapsulado y, si se desea, para adaptar el pH de la fase exterior. Se elimina el tinte sensible al pH no encapsulado de la dispersión de polimerosomas utilizando cualquier técnica conocida. Sin limitarse a ello, puede utilizarse la filtración (de flujo cruzado), la centrifugación (por ejemplo, la filtración centrífuga), la cromatografía de exclusión de tamaño (por ejemplo, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de filtración en gel), la diálisis o una combinación de estos métodos para eliminar el tinte sensible al pH no encapsulado.

La dispersión de polimerosomas purificados puede utilizarse tal como está (con solución ácida acuosa tanto en el exterior como en el interior de los polimerosomas o después de intercambiar la solución ácida externa por una solución a un pH más alto, por ejemplo, de 7 a 10), posteriormente se seca mediante procedimientos de secado farmacéuticos convencionales (por ejemplo, liofilización, secado por pulverización) y/o se incorpora en una tira diagnóstica. En todas estas formas (tal como están, purificados y/o secos), el núcleo del polimerosoma contiene un tinte sensible al pH, y opcionalmente, por ejemplo, si el tinte no está en una concentración requerida para producir un gradiente de pH suficiente para el análisis de la muestra, el núcleo de los polimerosomas también contiene un ácido. El ácido y/o el tinte sensible al pH proporcionan el gradiente de pH transmembrana al polimerosoma cuando se mezcla con la muestra (por ejemplo, fluido corporal) a analizar (con o sin un tampón adicional). Los polimerosomas formados según la presente invención pueden contener además sal (es decir, ácido parcialmente desprotonado con un contraión como sodio, potasio o calcio), que puede añadirse durante la preparación de los polimerosomas para ajustar el pH y/o la osmolaridad en el núcleo, y, en su forma hidratada, los polimerosomas contienen además agua. En modalidades específicas, el núcleo puede contener además un conservante, que se puede añadir durante la preparación de los polimerosomas para prevenir el crecimiento microbiano en el núcleo en casos donde, por ejemplo, el pH del núcleo es relativamente alto (por ejemplo, pH 5,5 o más). Después de su uso en los métodos de la presente invención, el núcleo puede contener además amoníaco. De acuerdo con modalidades específicas, el contenido del núcleo de los polimerosomas puede comprender o consistir en al menos un tinte sensible al pH. En otras modalidades, el núcleo puede comprender además al menos un ácido. En otras modalidades, el núcleo puede comprender además al menos una sal. En otras modalidades, el núcleo puede comprender además agua. En otras modalidades, el núcleo puede comprender además un conservante. En otras modalidades, el núcleo puede comprender además amoníaco. En otras modalidades, el contenido del núcleo del polimerosoma puede consistir en (a) al menos un tinte sensible al pH; y (b) (i) al menos un ácido; (ii) al menos una sal; (iii) agua; (iv) al menos un conservante; (v) amoníaco; o (vi) una combinación de al menos dos de (i) a (v).

Cuando los polimerosomas están hidratados (es decir, contienen un núcleo acuoso ácido), el pH en su núcleo generalmente está entre aproximadamente 1 y 6,5 (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5). En una modalidad específica, está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre

aproximadamente 3 y aproximadamente 4,5, y entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4.

Aunque no es necesario para la estabilidad de los polimerosomas de la presente invención, la membrana de los polimerosomas también puede estar reticulada. Por ejemplo, puede utilizarse una reacción de Friedel-Crafts con el agente de reticulación p-xilileno-dicloruro, 1,4-bis-clorometildifenilo, monoclorodimetil éter, dimetilformal, tris-(clorometil)-mesitileno o p,p'-bis-clorometil-1,4-difenilbutano para reticular poli(estireno) (Davankov y Tsyurupa, Reactive Polymers 1990; 13:27-42).

Solvente

El solvente utilizado en la presente invención disuelve el copolímero, y el solvente que contiene el polímero se mezcla luego con la fase acuosa ácida. Durante el paso de mezcla (por ejemplo, emulsión ac/a), se forma una fina dispersión del polímero en la fase acuosa. Después del paso de mezcla, se elimina el solvente (por ejemplo, evaporándolo) para garantizar que se mantenga la estabilidad de los polimerosomas (por ejemplo, el solvente podría potencialmente plastificar la membrana, lo que resultaría en polimerosomas más permeables).

Se puede utilizar una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 40 % (v/v) de relación fase de solvente/fase acuosa. En una modalidad específica, la relación fase de solvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % a 30 % (v/v). En otra modalidad específica, la relación fase de solvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % a 20 % (v/v). En otra modalidad específica, la relación fase de solvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % a 15 % (v/v). En otra modalidad específica, la relación fase de solvente/fase acuosa es de aproximadamente 10 % (v/v). En una modalidad específica, la relación de fase de solvente/fase acuosa en la emulsión resultante es aproximadamente del 9 % (v/v). En modalidades específicas, el solvente es un solvente orgánico.

Sin limitarse a ello, el solvente puede ser un solvente clorado (por ejemplo, diclorometano, ver por ejemplo, los Ej. 2-16 o cloroformo), un solvente aromático o derivados de solventes aromáticos (por ejemplo, areno o derivado de areno tal como el tolueno), un solvente alifático o derivado de solvente alifático (por ejemplo, hexano, 1-hexanol), una cetona o derivado de cetona (por ejemplo, 2-hexanona), un éter o derivado de éter (por ejemplo, éter dietílico), o mezclas de los mismos (por ejemplo, al utilizar una emulsión ac/a, una doble emulsión a/ac/a o una técnica de evaporación en fase inversa).

En una modalidad específica, cuando se utiliza una emulsión ac/a para mezclar la fase orgánica que contiene el polímero y la fase acuosa, los solventes útiles para la presente invención son solventes orgánicos inmiscibles en agua o parcialmente inmiscibles en agua. Sin limitarse a ellos, dichos solventes incluyen, por ejemplo, diclorometano (ver, por ejemplo, los Ej. 2-16), cloroformo, solvente aromático o derivados de solvente aromático (por ejemplo, areno o derivado de areno tal como el tolueno), solvente alifático o derivado de solvente alifático (por ejemplo, hexano, 1-hexanol), cetona o derivado de cetona (por ejemplo, 2-hexanona), éter o derivado de éter (por ejemplo, éter dietílico), o mezclas de los mismos.

Ácido y solución ácida

En una modalidad específica, el tinte sensible al pH es el ácido que promueve el gradiente de pH transmembrana. Los tintes sensibles al pH de ácido débil presentes en concentraciones suficientemente altas (por ejemplo, piranina a 10 mM) podrían utilizarse sin un ácido adicional (ver el Ej. 13). Sin limitarse a ello, el tinte HPTS sensible al pH (por ejemplo, piranina), por ejemplo, se tampona alrededor de pH 5,5 (es decir, aproximadamente 1,7 unidades de pH por debajo de su pKa de 7,2 (Kano y Fendler BBA Biomembranes 1978; 509:289-299)), lo cual permite la detección de amoníaco en ausencia de un ácido adicional. En modalidades específicas, el ácido utilizado no es el tinte sensible al pH para mediciones óptimas de amoníaco (ver los Ej. 2-12, 14-16). Como se utiliza en el presente documento, el término "ácido débil" se refiere a ácidos débiles con un valor de pKa de 3,5 o mayor y ácidos moderadamente fuertes con un valor de pKa de -0,35 o mayor (Mortimer y Mueller, Chemie, 12ª edición, Thieme, 2015).

Sin limitarse a ello, el ácido contenido en el núcleo del polimerosoma es (i) un hidroxiácido tal como el ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido tartárico o ácido tártrico; (ii) un ácido alifático tal como ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, ácido acético) o ácidos insaturados (por ejemplo, ácido sórbico); (iii) un ácido azúcar tal como ácido urónico; (iv) un ácido dicarboxílico tal como ácido malónico; (v) un ácido tricarboxílico tal como ácido propano-1,2,3-tricarboxílico o ácido aconítico; (vi) un ácido tetracarboxílico tal como ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico; (vii) un ácido pentacarboxílico tal como ácido 1,2,3,4,5-pentanopentacarboxílico; (viii) un poli(ácido carboxílico) polimérico tal como poli(ácido acrílico) o poli(ácido metacrílico); (ix) un ácido poliaminocarboxílico tal como ácido etilendiaminotetraacético; (x) un aminoácido tal como ácido glutámico o ácido aspártico; (xi) un ácido inorgánico tal como ácido nítrico, ácido sulfúrico, haluros de hidrógeno; (xii) un ácido carboxílico aromático tal como ácido benzoico; (xiii) un tinte ácido sensible al pH tal como, pero no limitado a, hidroxipireno y sus derivados (por ejemplo, piranina, también conocida como sal trisódica de HPTS), fenilpiridiloxazol y sus derivados (por ejemplo, Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano), aminonaftaleno y sus derivados (por ejemplo, ANTS), cianina y sus derivados (por ejemplo, IRDye™ 680RD), tintes de triarilmetano (por ejemplo, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, rojo cresol, rojo clorofenol, rojo fenol, fenolftaleína, azul de timol, azul de bromotimol), tintes azoicos

(por ejemplo, rojo de metilo, eriocromo negro T), tintes de nitrofenol (por ejemplo, 2,4-dinitrofenol), tintes de antraquinona (por ejemplo, alizarina); o (xiv) una combinación de al menos dos de los mismos. En una modalidad específica, se utiliza ácido cítrico; en otra modalidad específica, se utiliza HPTS. El uso de un tinte sensible al pH conjugado con polímero (por ejemplo, Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano, isotiocianato de fluoresceína conjugado con dextrano, fluoresceína conjugada con metoxi poli(óxido de etileno), rodamina B conjugada con dextrano) podría ser ventajoso para reducir la fuga del tinte después de la purificación. Cualquier polímero soluble en agua, tal como, pero sin limitarse a ello, dextrano, poli(óxido de etileno), poli(vinilpirrolidona) o poli(alcohol vinílico), podría entonces conjugarse al tinte.

Aunque ciertos de los ácidos mencionados anteriormente pueden tener ciertas actividades farmacológicas, en ciertas dosis, el ácido encapsulado utilizado en ciertas modalidades específicas del polimerosoma de la presente invención no tiene como objetivo ejercer una función farmacológica o de imagen directa, sino que se utiliza únicamente para crear el gradiente de pH transmembrana y, cuando el ácido también es el tinte sensible al pH, para detectar cambios de pH relacionados con el amoníaco en el núcleo. La presente invención incluye el uso de cualquiera de los ácidos mencionados anteriormente, ya sea que también posean ciertas actividades farmacológicas o no. Sin embargo, de acuerdo con ciertas modalidades o aspectos de la presente invención, el ácido puede no ser un ácido, aparte de cualquiera de los ácidos mencionados anteriormente, que se conozca como un antibiótico, un fármaco anticancerígeno, un fármaco antihipertensivo, un fármaco antifúngico, un fármaco ansiolítico, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco inmunomodulador, un fármaco antiviral o un agente reductor de lípidos.

En modalidades específicas, la concentración de ácido utilizada en el método puede variar entre 0,1 y 100 mM y una osmolalidad de 50 a 700 mOsmol/kg. Cuando se utiliza ácido cítrico, se utiliza óptimamente una solución de ácido cítrico de entre aproximadamente 0,5 mM y 50 mM, con una osmolalidad de 150 - 600 mOsmol/kg. En otra modalidad específica, la osmolalidad está entre 100 y 750 mOsmol/kg. En otra modalidad específica, la osmolalidad está entre 100 y 700 mOsmol/kg. En otra modalidad específica, la osmolalidad está entre 115 y 700 mOsmol/kg. La concentración de ácido se selecciona de manera que no influya en la sensibilidad del ensayo, y, cuando el ácido utilizado también es el tinte sensible al pH, la concentración de ácido se selecciona para permitir también mediciones fiables de fluorescencia o absorbancia.

El ácido dentro del núcleo está presente en una concentración que produce un pH entre 1 y 6,8, en una modalidad más específica, de 1 a 6,5, de 2 a 6, cuando el polimerosoma está hidratado. En una modalidad específica, se utiliza un pH de aproximadamente 5,5. En otra modalidad específica, se utiliza un pH de aproximadamente 3,0. En otra modalidad específica, se utiliza un pH de aproximadamente 2,0.

Método de uso

La presente invención incluye un método de uso de los polimerosomas con gradiente de pH transmembrana de la presente invención para la cuantificación de amoníaco en diversas muestras. El método puede detectar la concentración de amoníaco tan baja como aproximadamente 0,005 mM y tan alta como 8 mM.

En modalidades específicas, la concentración precisa de amoníaco en la muestra analizada puede determinarse mediante los siguientes métodos.

De acuerdo con un método, la concentración de amoníaco en una muestra puede evaluarse mediante el contacto de la muestra con un polimerosoma (es decir, que contiene un tinte sensible al pH) de la presente invención (o con una composición o tira que contiene el polimerosoma), y medición de al menos una propiedad espectroscópica dependiente del pH en la muestra que contiene el polimerosoma, la muestra que contiene la composición o la tira que contiene la muestra. La concentración de amoníaco en la muestra puede deducirse mediante la comparación de la propiedad espectroscópica medida con la propiedad espectroscópica (es decir, absorbancia o intensidad de fluorescencia) en la misma longitud de onda dependiente del pH en una curva estándar de concentraciones de amoníaco conocidas. La curva estándar se prepara primero por determinación de una "propiedad espectroscópica de referencia correspondiente" obtenida en las condiciones específicas utilizadas en el ensayo para cada concentración de amoníaco específica. Más particularmente, se determina la propiedad espectroscópica producida por el mismo tinte sensible al pH en la misma longitud de onda dependiente del pH, en el núcleo del mismo polimerosoma con gradiente de pH transmembrana específico, con la misma concentración específica de ácido en el pH específico en el núcleo, utilizado para analizar una muestra con una cantidad desconocida de amoníaco, si la hubiera, en presencia de cada concentración de amoníaco específica fuera y dentro del polimerosoma. La "curva estándar" es una curva obtenida mediante un procedimiento de ajuste matemático a un conjunto de propiedades espectroscópicas de referencia correspondientes medidas para todas las concentraciones de amoníaco analizadas en estas condiciones. El número de concentraciones de amoníaco analizadas utilizadas para generar la curva estándar es de al menos una (es decir, si la curva estándar es lineal en el rango dado, una concentración puede ser suficiente).

Como se utiliza en el presente documento, el término "propiedad espectroscópica" se refiere a la absorbancia o intensidad de fluorescencia en el espectro electromagnético de aproximadamente 10-2000 nm, es decir, en las regiones ultravioleta (aproximadamente 10-390 nm), visible (aproximadamente 390-700 nm) y de infrarrojo cercano

(NIR, aproximadamente 700-2000 nm) del espectro.

Como se utiliza en el presente documento, el término "curva estándar" es un término genérico utilizado para incluir los términos "curva estándar de absorbancia" y "curva estándar de fluorescencia".

Alternativamente, se puede determinar una "relación de propiedades espectroscópicas" al normalizar la propiedad espectroscópica del tinte en una longitud de onda dependiente del pH con respecto a la propiedad espectroscópica del mismo tinte o de otro tinte en una longitud de onda independiente del pH o en otra longitud de onda dependiente del pH. Si el tinte utilizado no tiene una longitud de onda independiente del pH, puede utilizarse un segundo tinte con una longitud de onda independiente del pH como referencia para calcular la relación. La relación de propiedades espectroscópicas determinada en la muestra puede compararse con una curva estándar de relación de propiedad espectroscópica universal, obtenida a partir de las relaciones de propiedad espectroscópica de referencia universales calculadas para cada concentración de amoníaco en las mismas longitudes de onda, y de esta manera puede anular la necesidad de una curva estándar diferente obtenida para cada conjunto específico de condiciones de ensayo. Por supuesto, aún se puede preparar una curva estándar de relación de propiedad espectroscópica específica a partir de las correspondientes relaciones de propiedades espectroscópicas de referencia medidas y calculadas para las condiciones específicamente analizadas ("curva estándar de relación de propiedad espectroscópica específica") para lograr una precisión óptima.

Como se utiliza en el presente documento, el término "relación de propiedades espectroscópicas de referencia universales" se refiere a la relación de propiedades espectroscópicas producida por un tinte sensible al pH en una longitud de onda dependiente del pH y en una longitud de onda independiente del pH (o en otra longitud de onda dependiente del pH), en el núcleo de un polimerosoma con gradiente de pH transmembrana, con una cierta concentración de ácido a un pH determinado, en presencia de una concentración de amoníaco tanto dentro como fuera del polimerosoma, en un fluido. La "curva estándar de relación de propiedad espectroscópica universal" es una curva producida mediante un procedimiento de ajuste de curva matemático para el conjunto de relaciones de propiedades espectroscópicas de referencia universales calculadas en estas condiciones para todas las concentraciones de amoníaco analizadas. El número de concentraciones de amoníaco analizadas utilizadas para generar la curva estándar es de al menos una (es decir, si la curva estándar es lineal en el rango dado, una concentración puede ser suficiente).

Como se utiliza en el presente documento, el término "curva estándar de relación de propiedades espectroscópicas" es un término genérico utilizado para incluir los términos "curva estándar de relación de propiedad espectroscópica específica" y "curva estándar de relación de propiedad espectroscópica universal". Como se utiliza en el presente documento, los términos "curva estándar de relación de propiedad espectroscópica específica" y "curva estándar de relación de propiedad espectroscópica universal" son términos genéricos utilizados para referirse a "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia específicas" y "curva estándar de relación de absorbancias específicas"; y "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia universales" y "curva estándar de relación de absorbancias universales".

Como se utiliza en el presente documento, el término "longitud de onda dependiente del pH" y "longitud de onda independiente del pH" son términos genéricos utilizados para incluir los términos "longitud de onda de fluorescencia dependiente del pH" y "longitud de onda de absorbancia dependiente del pH"; y "longitud de onda de fluorescencia independiente del pH" y "longitud de onda de absorbancia independiente del pH", respectivamente.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "propiedad espectroscópica dependiente del pH" y "propiedad espectroscópica independiente del pH" son términos genéricos utilizados para incluir los términos "intensidad de fluorescencia dependiente del pH" y "absorbancia dependiente del pH"; e "intensidad de fluorescencia independiente del pH" y "absorbancia independiente del pH", respectivamente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "relación de propiedades espectroscópicas" es un término genérico utilizado para incluir los términos "relación de intensidad de fluorescencia" y "relación de absorbancia".

Más específicamente, el método espectroscópico anterior puede ser un método fluorescente o colorimétrico. Tales métodos pueden definirse más detalladamente a continuación.

Métodos de fluorescencia

De acuerdo con un método, la concentración de amoníaco en una muestra se puede deducir al referirse a la intensidad de fluorescencia en las mismas longitudes de onda de emisión y excitación en una curva estándar de intensidad de fluorescencia de concentraciones de amoníaco conocidas. La curva estándar de intensidad de fluorescencia se prepara primero por determinación de una "intensidad de fluorescencia de referencia correspondiente" obtenida en las condiciones específicas utilizadas en el ensayo para cada concentración de amoníaco específica. Más particularmente, se determina la fluorescencia producida por el mismo tinte fluorescente específico sensible al pH, a la misma longitud de onda de excitación o emisión específica dependiente del pH, en el núcleo del mismo polimerosoma con gradiente de pH transmembrana específico, con la misma concentración

específica de ácido en el pH específico en el núcleo, utilizados para analizar una muestra con una cantidad desconocida de amoníaco, si la hubiera, en presencia de cada concentración de amoníaco específica fuera y dentro del polimerosoma. La "curva estándar de intensidad de fluorescencia" es una curva obtenida mediante un procedimiento de ajuste matemático a un conjunto de intensidades de fluorescencia de referencia correspondientes medidas para todas las concentraciones de amoníaco analizadas en estas condiciones. El número de concentraciones de amoníaco analizadas utilizadas para generar la curva estándar es de al menos una (es decir, si la curva estándar es lineal en el rango dado, una concentración puede ser suficiente).

Alternativamente, se puede determinar una "relación de intensidad de fluorescencia" al normalizar la intensidad de fluorescencia del tinte en una longitud de onda dependiente del pH (emisión o excitación) con respecto a la intensidad de fluorescencia del mismo tinte o de otro tinte en una longitud de onda independiente del pH (isosbética) (emisión o excitación). Si el tinte utilizado no tiene una longitud de onda independiente del pH, puede utilizarse un segundo tinte con una longitud de onda independiente del pH como referencia para calcular la relación. La relación de intensidad de fluorescencia determinada en la muestra puede compararse luego con una curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia universal, obtenida a partir de las relaciones de intensidad de fluorescencia de referencia universales calculadas para cada concentración de amoníaco en las mismas longitudes de onda, y de esta manera puede anular la necesidad de una curva estándar de intensidad de fluorescencia diferente obtenida para cada conjunto específico de condiciones de ensayo. Por supuesto, aún se puede preparar una curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia específica a partir de las correspondientes relaciones de intensidad de fluorescencia de referencia medidas y calculadas para las condiciones específicamente analizadas ("curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia específica") para lograr una precisión óptima.

Como se utiliza en el presente documento, el término "relación de intensidad de fluorescencia de referencia universal" se refiere a la relación de intensidad de fluorescencia producida por un tinte fluorescente sensible al pH en una longitud de onda dependiente del pH (emisión o excitación) y en una longitud de onda independiente del pH (emisión o excitación), en el núcleo de un polimerosoma con gradiente de pH transmembrana, con una cierta concentración de ácido a un pH determinado, en presencia de una concentración de amoníaco tanto dentro como fuera del polimerosoma, en un fluido. La "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia universal" es una curva producida mediante un procedimiento de ajuste de curva matemático para el conjunto de relaciones de intensidad de fluorescencia de referencia universal calculadas en estas condiciones para todas las concentraciones de amoníaco analizadas. El número de concentraciones de amoníaco analizadas utilizadas para generar la curva estándar es de al menos una (es decir, si la curva estándar es lineal en el rango dado, una concentración puede ser suficiente).

Como se utiliza en el presente documento, el término "curva estándar de fluorescencia" es un término genérico utilizado para incluir los términos "curva estándar de intensidad de fluorescencia" y "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia". Como se utiliza en el presente documento, el término "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia" es un término genérico utilizado para incluir el término "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia específica" y "curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia universal".

Como se utiliza en el presente documento, los términos "longitud de onda de excitación dependiente del pH" y "longitud de onda de excitación independiente del pH" se refieren a una longitud de onda de excitación cuya excitación conduce a una intensidad de fluorescencia dependiente del pH y una intensidad de fluorescencia independiente del pH, respectivamente, en una cierta longitud de onda de emisión. Como se utiliza en el presente documento, los términos "longitud de onda de emisión dependiente del pH" y "longitud de onda de emisión independiente del pH" se refieren a una longitud de onda de emisión que muestra una intensidad de fluorescencia dependiente del pH y una intensidad de fluorescencia independiente del pH, respectivamente, si se excita a una cierta longitud de onda de excitación. Como se utiliza en el presente documento, el término "longitud de onda de fluorescencia dependiente del pH" se refiere a una longitud de onda de emisión dependiente del pH o una longitud de onda de excitación dependiente del pH. Como se utiliza en el presente documento, el término "longitud de onda de fluorescencia independiente del pH" se refiere a una longitud de onda de emisión independiente del pH o una longitud de onda de excitación independiente del pH.

Como se utiliza en el presente documento, el término "intensidad de fluorescencia dependiente del pH" se refiere a una intensidad de fluorescencia generada ya sea en una longitud de onda de emisión dependiente del pH o en una longitud de onda de excitación dependiente del pH, o a una intensidad de fluorescencia generada tanto en una longitud de onda de emisión dependiente del pH como en una longitud de onda de excitación dependiente del pH. Como se utiliza en el presente documento, el término "intensidad de fluorescencia independiente del pH" se refiere a una intensidad de fluorescencia generada en una longitud de onda de emisión independiente del pH y una longitud de onda de excitación independiente del pH,

Las intensidades de fluorescencia se seleccionan ya sea como lo indica el proveedor del tinte o mediante el registro de espectros de emisión y excitación a diferentes valores de pH y mediante la identificación de longitudes de onda de fluorescencia dependientes del pH y longitudes de onda de fluorescencia independientes del pH.

Métodos colorimétricos

De acuerdo con otro método, la concentración de amoniaco se puede deducir al referirse a la absorbancia en la misma longitud de onda ultravioleta, visible o NIR en una curva de absorbancia estándar de concentraciones de amoniaco conocidas. La curva estándar de absorbancia se prepara primero por determinación de una "absorbancia de referencia correspondiente" obtenida en las condiciones específicas utilizadas en el ensayo para cada concentración de amoniaco específica. Más particularmente, se determina la absorbancia del mismo tinte de absorbancia sensible al pH en la misma longitud de onda específica de luz visible dependiente del pH, en el núcleo del mismo polimerosoma con gradiente de pH transmembrana específico, con la misma concentración específica de ácido en el pH específico en el núcleo, como las utilizadas para analizar una muestra con una cantidad desconocida de amoniaco, si la hubiera, en presencia de cada concentración de amoniaco específica fuera y dentro del polimerosoma. La "curva estándar de absorbancia" es una curva obtenida mediante un procedimiento de ajuste matemático a un conjunto de valores de absorbancia de referencia correspondientes medidos para todas las concentraciones de amoniaco analizadas en estas condiciones. El número de concentraciones de amoniaco analizadas utilizadas para generar la curva estándar es de al menos una (es decir, si la curva estándar es lineal en el rango dado, una concentración puede ser suficiente).

Como se utiliza en el presente documento, el término "longitud de onda de absorbancia dependiente del pH" se utiliza para referirse a una longitud de onda en la cual el tinte absorbe luz en la región ultravioleta (aproximadamente de 10 a 390 nm), visible (aproximadamente de 390 a 700 nm) o NIR (aproximadamente de 700 a 2000 nm) del espectro electromagnético, en función del pH del medio. Las longitudes de onda de absorbancia se seleccionan ya sea según lo indicado por el proveedor del tinte o mediante la grabación de espectros de absorbancia a diferentes valores de pH y mediante la identificación de longitudes de onda de absorbancia dependientes del pH y longitudes de onda de absorbancia independientes del pH.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "absorbancia dependiente del pH" y "absorbancia independiente del pH" se refieren a una absorbancia en una longitud de onda dependiente del pH y una longitud de onda de absorbancia independiente del pH, respectivamente.

Se pueden utilizar espectrofotómetros convencionales a escala de laboratorio o portátiles (por ejemplo, espectrofotómetros estándar para métodos colorimétricos o espectrofotómetros de fluorescencia para métodos de fluorescencia) y lectores de placas para medir la absorbancia o fluorescencia de acuerdo con la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, las "muestras" que pueden analizarse para determinar el contenido de amoniaco (o indirectamente, fenilalanina) de acuerdo con la presente invención pueden ser, sin limitarse a ello, una muestra que pueda contener amoniaco o fenilalanina, que incluye una muestra biológica tal como una muestra de fluido corporal, muestra de suelo, muestra de aguas residuales o simples tampones. Las muestras pueden ser inherentemente fluidos o convertirse en fluidos después de la adición de una solución acuosa (por ejemplo, muestra de suelo). Las muestras (inherentemente fluidas o que se vuelven fluidas después de la adición de una solución acuosa) pueden modificarse adicionalmente mediante la adición opcional de un tampón y/o enzimas (por ejemplo, para la estabilización o ajuste del pH y para reacciones enzimáticas generadoras de amoniaco, respectivamente). De acuerdo con modalidades específicas, la muestra puede comprender o consistir en una muestra biológica (por ejemplo, fluido corporal). En otras modalidades, la muestra puede comprender además una solución acuosa. En otras modalidades, la muestra puede comprender además al menos un tampón. En otras modalidades, la muestra puede comprender además al menos una enzima (por ejemplo, fenilalanina amonio liasa). En otras modalidades, la muestra puede consistir en (a) una muestra biológica (por ejemplo, fluido corporal); y (b) (i) una solución acuosa; (ii) al menos un tampón; (iii) una enzima (por ejemplo, fenilalanina amonio liasa); o (iv) una combinación de al menos dos de (i) a (iii). No es necesario ni útil eliminar la fenilalanina amonio liasa de la solución de muestra antes de mezclarla con polimerosomas.

El tiempo de incubación de los polimerosomas en la muestra puede variar dependiendo de la naturaleza de las muestras. Para muestras biológicas, el tiempo de incubación se limita de manera óptima para evitar la degradación de proteínas. Como se muestra en la presente descripción, se pueden realizar lecturas confiables de propiedades espectroscópicas (es decir, intensidad de fluorescencia y/o absorbancia) en muestras biológicas después de tiempos de incubación tan cortos como 2 minutos y hasta 15 minutos (ver la Figura 2). Para muestras no biológicas, es decir, simples tampones, se puede aumentar el tiempo de incubación evitando la evaporación de amoniaco.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "líquido corporal" se refieren a cualquier fluido de un vertebrado. En una modalidad específica, se refiere a un fluido de un mamífero. Sin limitarse a ello, incluye sangre (como si se utilizara un tinte NIR en un método de fluorescencia o absorbancia de la presente invención, o después de que los eritrocitos se hayan eliminado, por ejemplo, mediante un filtro), fracción de sangre (por ejemplo, suero, plasma), saliva, orina, sudor, semen, líquido peritoneal, líquido de ascitis y líquido cefalorraquídeo. Ciertos fluidos corporales pueden contener niveles de amoniaco o niveles específicos de aminoácidos que pueden proporcionar información sobre el sujeto (por ejemplo, en términos de la presencia o indicación de la presencia de una enfermedad o afección en el sujeto, la eficacia o no eficacia de un tratamiento o medida preventiva, o el desarrollo de efectos secundarios resultantes de la administración de un medicamento). En los ejemplos a continuación, ciertos fluidos corporales se han diluido por un factor seleccionado para que se encuentren dentro del rango de medición del kit comercial de ensayo de amoniaco utilizado para la comparación.

Como se utiliza en el presente documento, una "enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco" incluye hiperamonemia (por ejemplo, inducida por una función hepática deteriorada o inducida por la terapia con ácido valproico), encefalopatía hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática aguda-crónica, baipás portosistémico, derivación portosistémica, hiperamonemia inducida por fármacos, deficiencia congénita en el metabolismo hepático del amoniaco (hiperamonemia primaria), deficiencia congénita que afecta el metabolismo hepático del amoniaco (hiperamonemia secundaria), enfermedad renal crónica y fertilidad reducida asociada con el amoniaco. La sangre y sus fracciones (suero, plasma) pueden utilizarse como muestras de fluidos corporales para la mayoría de las enfermedades o trastornos asociados con el amoniaco. La saliva puede utilizarse como muestra de fluido corporal para la enfermedad renal crónica y el semen puede utilizarse como muestra de fluido corporal para la fertilidad reducida asociada con el amoniaco.

Ciertas enfermedades se caracterizan por un nivel elevado de aminoácidos en el(los) fluido(s) corporal(es) del sujeto. Por ejemplo, los sujetos que padecen fenilcetonuria tienen un nivel elevado de fenilalanina en la sangre. La fenilcetonuria es un error congénito del metabolismo que resulta en niveles bajos de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH), lo que conduce a un metabolismo disminuido del aminoácido fenilalanina y, por lo tanto, a un aumento en el nivel de fenilalanina en la sangre (van Spronsen y otros, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017; 5:743-756). Tal nivel aberrante de aminoácido puede cuantificarse indirectamente mediante la incubación inicial de la muestra con una enzima productora de amoniaco (por ejemplo, fenilalanina amonio-liasas para la fenilalanina), y luego utilizando el método de cuantificación de amoniaco de la presente invención para determinar indirectamente el nivel de aminoácido. La fenilalanina amonio liasa (EC 4.3.1.24) es una enzima que cataliza una reacción que convierte L-fenilalanina en amoniaco y ácido trans-cinámico.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto que puede tener niveles de amoniaco o aminoácidos en su muestra de fluido corporal que se cuantificarían ventajosamente por el método de la presente invención. Se refiere a un vertebrado, en una modalidad específica a un mamífero y en una modalidad más específica a un humano. Los polimerosomas o composiciones de la presente invención también pueden utilizarse en investigaciones preclínicas o en aplicaciones veterinarias y utilizarse en mascotas u otros animales (por ejemplo, mascotas tales como gatos, perros, caballos, etc.; y ganado, peces, cerdos, aves de corral, etc.).

En modalidades específicas, el sujeto presenta una enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco o fenilcetonuria. En otra modalidad, el sujeto se somete a un tratamiento antihiperamonémico (por ejemplo, hemodiálisis, diálisis peritoneal con soporte de liposomas) o un tratamiento antifenilcetonúrico (por ejemplo, un régimen dietético bajo en fenilalanina).

En otra modalidad específica, se sospecha que el sujeto tiene, o es un candidato probable para tener una enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco o fenilcetonuria. Sin limitarse a ello, dichos sujetos incluyen, por ejemplo, pacientes que padecen trastornos del ciclo de la urea, encefalopatía hepática, deficiencia de fenilalanina hidroxilasa o tetrahidrobiopterina, y pacientes en tratamiento con fármacos que inducen hiperamonemia (por ejemplo, L-asparaginasa, ácido valproico).

Por lo tanto, en modalidades específicas, la muestra de fluido corporal puede ser de cualquiera de dichos sujetos.

Dependiendo del tipo de ensayo realizado, la "concentración de amoniaco de referencia" puede seleccionarse a partir de un nivel estándar establecido de amoniaco en la muestra específica de fluido corporal, una concentración de amoniaco correspondiente determinada en una muestra correspondiente del sujeto en un momento anterior (por ejemplo, cuando el método se utiliza para monitorear la efectividad de un tratamiento antihiperamonémico o antifenilcetonúrico o el impacto de un tratamiento que induce hiperamonemia); una concentración de amoniaco determinada en el fluido biológico correspondiente de uno o más sujetos conocidos por no estar predispuestos a ciertas enfermedades o afecciones (por ejemplo, enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco o fenilcetonuria) y/o conocidos por no tener ciertas enfermedades o afecciones (por ejemplo, enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco o fenilcetonuria). En otra modalidad, la concentración de amoniaco de referencia es el valor promedio o mediano obtenido después de determinar la concentración de amoniaco en una pluralidad de muestras (por ejemplo, muestras obtenidas de varios sujetos sanos o muestras obtenidas de varios sujetos que tienen ciertas enfermedades o afecciones (por ejemplo, enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco o fenilcetonuria)).

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento inductor de hiperamonemia" se refiere a tratamientos que pueden resultar en hiperamonemia o para los cuales la hiperamonemia es un efecto secundario reportado. Sin limitarse a ello, se refiere a la terapia con ácido valproico y el tratamiento con L-asparaginasa (Ando y otros, Biopsycho Soc Med. 2017; 11:19; Strickler y otros, Leuk Lymphoma 2017).

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento antihiperamonémico" se refiere a cualquier intervención terapéutica farmacológica (por ejemplo, fenilbutirato de sodio (Buphenyl®), fenilbutirato de glicerol (Ravicti®), fenilacetato de sodio y benzoato de sodio (Ucephan®, Ammonul®), ácido carglúmico (Carbaglu®), administración de lactulosa disacárido no absorbible, rifaximina (por ejemplo, Xifaxan™), adsorbente de carbono esférico (AST-120, Kremezin®), y/o administración de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana (ver, por ejemplo, solicitud PCT en trámite núm.: PCT/IB2017/054966 presentada el 15 de agosto de 2017), Matoori y Leroux

supra)); y/o intervención terapéutica no farmacológica (por ejemplo, hemodiálisis) dirigida a reducir los niveles de amoníaco en los fluidos corporales. También se refiere a cualquier medida preventiva (por ejemplo, administración preventiva de lactulosa y/o rifaximina, manejo de peritonitis bacteriana espontánea o sangramiento gastrointestinal en pacientes con HE, Vilstrup y otros, supra) destinada a prevenir un aumento en los niveles de amoníaco en los fluidos corporales. Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento antifenilcetonúrico" se refiere a cualquier intervención terapéutica farmacológica (por ejemplo, tetrahidrobiopterina, van Spronsen y otros, supra) o no farmacológica (por ejemplo, un régimen dietético bajo en fenilalanina, van Spronsen y otros, supra) destinada a reducir los niveles de fenilalanina en los fluidos corporales o a cualquier medida preventiva (por ejemplo, un régimen dietético bajo en fenilalanina, van Spronsen y otros, supra) destinada a prevenir un aumento en los niveles de fenilalanina en los fluidos corporales.

En modalidades específicas donde la muestra analizada es una muestra de suelo o agua residual, el método de cuantificación puede utilizarse para cuantificar (por ejemplo, determinar la concentración de) la contaminación de amoníaco en estas matrices (por ejemplo, en caso de contaminación del agua residual con fertilizantes que contienen amoníaco o residuos industriales).

Composiciones

Los polimerosomas pueden mezclarse en las muestras a analizar (por ejemplo, para la concentración de amoníaco) en diferentes formas, por ejemplo, pueden dispersarse en un medio acuoso (por ejemplo, agua) (potencialmente con excipientes, por ejemplo, conservantes) o en su forma seca (por ejemplo, depositados en una tira).

Los polimerosomas de la presente invención pueden almacenarse en forma líquida (por ejemplo, suspensión líquida) o en forma sólida (por ejemplo, polvo para reconstitución antes de su uso o depositados en una tira diagnóstica).

La presente invención también se refiere al uso de los polimerosomas y/o composiciones en la preparación de un reactivo diagnóstico.

Las composiciones de la invención pueden contener uno o más excipientes, que incluye, sin limitación, conservantes (por ejemplo, azida de sodio, ácido sórbico/sales de sorbato, ácido benzoico/sales de benzoato, parabenos), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico y sus sales, ácido eritórbito y sus sales) y/o sales. Cuando los polimerosomas están en forma seca, podrían formularse adicionalmente con crioprotectores y/o lioprotectores (azúcares tales como trehalosa, sacarosa y sucralosa; polialcoholes tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico), y/o agentes de relleno (por ejemplo, azúcares, derivados de celulosa). Los polimerosomas también podrían incorporarse en una tira (por ejemplo, una tira diagnóstica). El soporte para dicha tira puede ser, por ejemplo, un polímero (papel, membrana, plástico) o un andamio inorgánico.

Kits

También dentro del alcance de la invención se encuentran kits que comprenden (a) al menos un tipo de polimerosomas, composiciones y/o tiras de la presente invención; y (b) (i) una solución para hidratar la polimerosoma (antes de su uso); (ii) un tampón para ajustar el pH (y/o la osmolaridad) de la fase exterior o muestra a analizar (por ejemplo, una muestra como un fluido corporal como sangre o fracción de sangre (por ejemplo, suero, plasma), saliva, orina, lágrimas, semen); (iii) un diluyente para diluir la muestra a analizar (por ejemplo, una muestra de suelo); (iv) una curva estándar de fluorescencia (por ejemplo, curva estándar de intensidad de fluorescencia y/o curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia) y/o una curva estándar de absorbancia; (v) una o varias soluciones de concentración de amoníaco conocida (soluciones estándar de amoníaco); o (vi) una combinación de al menos dos de (i) a (v), y, eventualmente, instrucciones para su uso (por ejemplo, para la cuantificación de amoníaco).

El kit puede contener además al menos un reactivo adicional (diagnóstico) y/o uno o más tipos adicionales de polimerosomas de la invención. Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otra manera acompaña al kit. El kit puede comprender además uno o más recipiente(s), reactivo(s), dispositivo(s) de administración.

Cantidad

La cantidad de polimerosomas o composiciones de los mismos de la invención a utilizar en la cuantificación (por ejemplo, determinación de la concentración) dependerá de muchos factores, que incluyen el pH del núcleo del polimerosoma, la concentración del tinte sensible al pH del núcleo del polimerosoma, la concentración de ácido en el núcleo del polimerosoma, la osmolaridad del núcleo del polimerosoma, la concentración de amoníaco en la fase exterior, el pH de la fase exterior y la osmolaridad de la fase exterior. La cantidad de los polimerosomas o composiciones de los mismos de la invención será una cantidad que cuantifique eficazmente el amoníaco en una muestra (por ejemplo, muestra de fluido corporal, suelo, aguas residuales o solución tampón). Sin limitarse a ello, en una modalidad específica, se estima que la concentración molar de polimerosomas en estado líquido se encuentra

en el rango de 100 nM a 100 mM. En otra modalidad específica, la concentración de polimerosomas expresada por la concentración de masa del polímero está entre 0,01 mg/ml y 100 mg/ml.

La presente invención incluye cualquier combinación de los polimerosomas descritos en el presente documento, o composiciones que los comprendan, en las relaciones descritas en el presente documento, preparadas utilizando el solvente descrito en el presente documento, el tinte sensible al pH y, eventualmente, ácido o soluciones ácidas utilizando las técnicas de mezcla de la fase orgánica y la fase acuosa descritas anteriormente.

El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se interpretará como que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos de alcance abierto (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario.

La mención de rangos de valores en el presente documento tiene la mera intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la descripción como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los subconjuntos de valores dentro de los rangos también se incorporan a la descripción como si se mencionaran individualmente en el presente documento.

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

El uso de cualquier y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como"), proporcionados en el presente documento, tiene la intención de iluminar mejor la invención y no impone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de otra manera. Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como indicativo de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

En este documento, el término "aproximadamente" tiene su significado común. En las modalidades, puede significar más o menos el 10 % del valor numérico calificado. En este documento, el término "aproximadamente" tiene su significado común. En las modalidades, puede significar más o menos el 10 % del valor numérico calificado.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

La presente invención se ilustra con más detalles mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Efecto de la L-lisina en la cuantificación de amoníaco basada en la reacción de Berthelot.

Diseño experimental. 0,3 mM de amoníaco sin y con L-lisina 15 mM en solución salina tamponada con fosfato (dihidrogenofosfato de potasio 1 mM, hidrogenofosfato de sodio 3 mM, cloruro de sodio 155 mM) a pH 7,4 se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente con los reactivos de Berthelot (solución de hipoclorito alcalino lista para usar y solución de nitroprusiato de fenol, ambos obtenidos de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza). La absorbancia de la solución se midió a 636 nm utilizando un espectrofotómetro. La presencia de L-lisina conduce a una subestimación de la concentración de amoníaco determinada por la reacción de Berthelot. Los resultados se muestran en la Figura 1 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 2: Curva estándar basada en la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron polimerosomas de PS-*b*-PEO utilizando un método de emulsión de aceite en agua (ac/a). Más particularmente, treinta mg de PS-*b*-PEO (relación PS/PEO de aproximadamente 1,4, PS(2770)-*b*-PEO(2000), Advanced Polymer Materials Inc) se disolvieron en 100 µl de un solvente orgánico (diclorometano). La solución de polímero en solvente orgánico (fase de solvente orgánico que contiene polímero, es decir, fase oleosa) se añadió por goteo a 1 ml de solución de ácido cítrico 1 mM a pH 5,5 con una osmolalidad de 300 mOsmol/kg que contiene piranina 10 mM (fase acuosa ácida), bajo sonicación en un baño de hielo para formar una emulsión con una relación de solvente/fase acuosa del 9 % (v/v). El solvente orgánico se evaporó utilizando un evaporador rotatorio durante al menos 5 minutos a 700 mbar a 40 °C. En esta etapa del proceso, hay ácido cítrico y el tinte fluorescente dentro y fuera de los polimerosomas. Para eliminar el tinte fluorescente no encapsulado y cambiar la fase de tampón externo por solución salina tamponada con fosfato (PBS, dihidrogenofosfato de potasio 1 mM, hidrogenofosfato de sodio 3 mM, cloruro de sodio 155 mM) a pH 7,4 a 300 mOsmol/kg, la dispersión de polimerosomas se purificó en una columna de filtración en gel de dextrano reticulado (límite de exclusión 5000 g/mol). Los polimerosomas resultantes encapsularon la solución de ácido cítrico de pH 5,5 y el tinte fluorescente. La concentración del tinte fluorescente se cuantificó utilizando la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm

excitada a 413 nm medida por un espectrofotómetro de fluorescencia.

Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen piranina (normalizados a una concentración de piranina de 0,057 mM) se incubaron con soluciones de PBS a pH 7,4 que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0-2 mM) a temperatura ambiente. En diferentes momentos (2,5; 5; 10 y 15 minutos), se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 455 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 413 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última.

La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 2 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 3: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en suero humano.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 2 con una concentración modificada de ácido cítrico de 5 mM y una fase exterior modificada en el procedimiento de purificación basado en columna (buffer de fosfato 50 mM a pH 7,4 a 300 mOsmol/kg).

Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen piranina (normalizados a una concentración de piranina de 0,016 mM) se incubaron con suero humano disponible comercialmente, suero humano enriquecido con amoníaco 0,1 mM y soluciones de PBS con diferentes concentraciones de amoníaco (0 - 0,5 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 min, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 455 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 413 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última. La concentración de amoníaco en el suero y en el suero enriquecido con amoníaco se determinó mediante la comparación con una curva de regresión lineal (curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia) derivada de las relaciones de intensidad de fluorescencia de los estándares de amoníaco. Además, las mismas soluciones se analizaron con un kit enzimático de amoníaco (Randox Ammonia Assay AM1015, Randox Laboratories Ltd) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con la modificación de utilizar solo el 30 % de los volúmenes indicados para permitir una medición en una placa de 96 pocillos con un lector de placas.

Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en suero humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 3 y se expresan como media y desviación estándar (n=3 para el ensayo de polimerosomas y n=8 para el kit enzimático).

Ejemplo 4: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en plasma humano.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3.

Cuantificación de amoníaco. La concentración de amoníaco en el plasma humano disponible comercialmente se cuantificó con polimerosomas que contienen piranina y un kit enzimático de amoníaco, como se describe en el Ejemplo 3.

Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en plasma humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 4 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 5: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en saliva humana.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3.

Cuantificación de amoníaco. La concentración de amoníaco en la saliva humana disponible comercialmente se cuantificó con polimerosomas que contienen piranina y un kit enzimático de amoníaco, como se describe en el Ejemplo 3, con una concentración modificada de piranina de 0,017 mM y una preparación modificada de fluido corporal enriquecida y no enriquecida con amoníaco (por dilución 1:10 (v/v) en PBS y adición de amoníaco 0,1 mM). Por último, los resultados se multiplicaron por el factor de dilución.

Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en la saliva humana nativa y enriquecida de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 5 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 5 Ejemplo 6: Efecto de L-lisina en la cuantificación de amoníaco basada en polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 2.

- 10 Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen piranina (normalizados a una concentración de piranina de 0,054 mM) se incubaron con una solución de PBS que contiene amoníaco 0,1 mM a pH 7,4 en presencia de L-lisina a 0, 1, 5 y 15 mM, y en estándares de amoníaco en PBS (0 - 0,5 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 455 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 413 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última. La concentración de amoníaco de las soluciones de amoníaco enriquecida con L-lisina y no enriquecida con L-lisina se determinó mediante comparación con una curva de regresión lineal (curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia) derivada de las relaciones de intensidad de fluorescencia de los estándares de amoníaco.

- 20 La presencia de hasta 15 mM de L-lisina (es decir, 100 veces la concentración plasmática normal, Aldred y otros, J Autism Dev Disord. 2003;33:93-97) no influye en la concentración de amoníaco medida por los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes. Los resultados se muestran en la Figura 6 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 7: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en orina humana.

- 30 Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3.

- 35 Cuantificación de amoníaco. La concentración de amoníaco en la orina humana disponible comercialmente se cuantificó con polimerosomas que contienen piranina y un kit enzimático de amoníaco, como se describe en el Ejemplo 5, con una preparación modificada de fluido corporal enriquecida y no enriquecida con amoníaco (por dilución 1:100 (v/v) en PBS y adición de amoníaco 0,1 mM). Por último, los resultados se multiplicaron por el factor de dilución.

- 40 Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en la orina humana nativa y enriquecida de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 7 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 45 Ejemplo 8: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en el sudor humano.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3.

- 50 Cuantificación de amoníaco. La concentración de amoníaco en el sudor humano disponible comercialmente se cuantificó con polimerosomas que contienen piranina y un kit enzimático de amoníaco, como se describe en el Ejemplo 3, con una preparación modificada de fluido corporal enriquecida y no enriquecida con amoníaco (por dilución 1:10 (v/v) en PBS y adición de amoníaco 0,1 mM). Por último, los resultados se multiplicaron por el factor de dilución.

- 55 Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en el sudor humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 8 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 60 Ejemplo 9: Cuantificación de amoníaco con polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina y un ensayo comercial enzimático de amoníaco en semen humano.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3.

- 65 Cuantificación de amoníaco. La concentración de amoníaco en el semen humano disponible comercialmente se cuantificó con polimerosomas que contienen piranina y un kit enzimático de amoníaco, como se describe en el

Ejemplo 3, con una preparación modificada de fluido corporal enriquecida y no enriquecida con amoníaco (por dilución 1:100 (v/v) en PBS y adición de amoníaco 0,1 mM). Por último, los resultados se multiplicaron por el factor de dilución.

- 5 Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina fueron capaces de cuantificar el amoníaco en semen humano nativo y enriquecido de manera similar al kit enzimático. Los resultados se muestran en la Figura 9 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 10 Ejemplo 10: Curva estándar basada en la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

- 15 Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3 con un tinte fluorescente modificado (Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano, 10 000 g/mol) a una concentración de 0,01 mM y una solución de ácido cítrico modificado con un pH de 2,0.

- 20 Cuantificación de amoníaco. Se incubaron polimerosomas que contienen Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano (normalizado a una concentración de Lysosensor™ Amarillo/Azul conjugado con dextrano de 0,0012 mM) con soluciones de PBS a pH 7,4 que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0 - 0,25 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 540 nm excitada a 360 nm (longitud de onda de emisión dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 485 nm excitada a 360 nm (longitud de onda de emisión independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última.

- 25 La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana conjugados con dextrano y que contienen Lysosensor™ Amarillo/Azul depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 10 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 30 Ejemplo 11: Curva estándar basada en la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen ANTS a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

- 35 Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3 con una composición de polímero PS-*b*-PEO modificada (relación PS/PEO de aproximadamente 1,8, PS(3570)-*b*-PEO(2000), Advanced Polymer Materials Inc) y un tinte fluorescente modificado (Ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico, sal disódica, ANTS) a una concentración de 10 mM y una solución de ácido cítrico modificada con un pH de 2,0.

- 40 Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen ANTS (normalizados a una concentración de ANTS de 0,008 mM) se incubaron con soluciones de PBS a pH 7,4 que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0-0,5 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 520 nm excitada a 368 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 520 nm excitada a 308 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última.

- 45 La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen ANTS depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 11 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

- 50 Ejemplo 12: Curva estándar basada en la intensidad de fluorescencia de los polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen carboxilato IRDye™ 680RD a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

- 55 Síntesis de polímero de PS(3700)-*b*-PEO(2000). La síntesis de PS(3700)-*b*-PEO(2000) se llevó a cabo mediante polimerización de radicales por transferencia atómica (ATRP). El PEO monometilado (2000) se convirtió en un macroiniciador de ATRP mediante una reacción con bromuro de 2-bromopropionilo en tetrahidrofurano (THF) seco y posteriormente se utilizó para polimerizar estireno a granel. Brevemente, el macroiniciador ATRP se cargó en un matraz Schlenk secado a la llama, junto con bromuro de cobre (CuBr) y 4,4'-dinoil-2,2'-dipiridilo como catalizador y ligando, respectivamente. El matraz de Schlenk se evacuó y rellenó con argón a través de varios ciclos para eliminar el oxígeno. En un matraz separado, el estireno se desoxigenó mediante el burbujeo de argón a través de él durante al menos una hora, y luego se cargó en el matraz de Schlenk. Luego la mezcla se calentó a 115 °C durante 16 horas y la solución del producto marrón se disolvió en THF, se filtró a través de una columna de alúmina básica y se precipitó dos veces en hexano. El precipitado se filtró y se secó al vacío. La relación de alimentación de [monómero]/[iniciador] fue de 50. La composición de PS/PEO se determinó mediante espectroscopía de resonancia

magnética nuclear.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes, como se describe en el Ejemplo 3, con una composición de polímero PS-*b*-PEO modificada (relación PS/PEO de aproximadamente 1,9, PS(3700)-*b*-PEO(2000)), un tinte fluorescente modificado (carboxilato IRDye™ 680RD) a una concentración de 0,04 mM, una concentración de solución de ácido cítrico modificada de 20 mM y pH de 3,0, y un procedimiento de cuantificación modificado (cuantificación de la concentración de polímero PS-*b*-PEO por dilución 1:20 (v/v) en dimetilformamida y determinación de la absorbancia a 271 nm utilizando un espectrofotómetro UV y mediante la comparación con una curva estándar de PS(3700)-*b*-PEO(2000) en dimetilformamida).

Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen carboxilato IRDye™ 680RD (normalizados a una concentración de PS-*b*-PEO de 0,73 mg/ml) se incubaron con soluciones de PBS a pH 7,4 que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0-0,625 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 696 nm excitada a 666 nm utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana y carboxilato IRDye™ 680RD depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 12 y se expresan como media y desviación estándar (n=4).

Ejemplo 13: Curva estándar basada en la relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato en ausencia de un ácido adicional en el núcleo del polimerosoma.

Síntesis de polímero de PS(3700)-*b*-PEO(2000). PS(3700)-*b*-PEO(2000) se sintetizó como se describe en el Ejemplo 12.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (m/v) en lugar de una solución de ácido cítrico y con una composición de polímero PS-*b*-PEO modificada (relación PS/PEO de aproximadamente 1,9, PS(3700)-*b*-PEO(2000)). Por lo tanto, el único ácido en el núcleo era el tinte fluorescente.

Cuantificación de amoníaco. La cuantificación de amoníaco se realizó como se describe en el Ejemplo 2 con una concentración modificada de piranina (0,017 mM), tiempo de incubación (10 min) y rango de concentración de amoníaco (0-8 mM).

La relación de intensidad de fluorescencia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina, en ausencia de otro ácido en el núcleo, depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 13 como un gráfico log-log y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 14: Relación de intensidad de fluorescencia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina con composiciones de polímero PS-*b*-PEO modificadas a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

Síntesis de polímero de PS(2400)-*b*-PEO(2000). La síntesis de PS(2400)-*b*-PEG(2000) se llevó a cabo mediante ATRP. El PEO monometilado (2000) se convirtió en un macroiniciador de ATRP mediante una reacción con bromuro de 2-bromoisobutirilo en THF seco y posteriormente se utilizó para polimerizar estireno en masa. Brevemente, el macroiniciador ATRP se cargó en un matraz Schlenk secado a la llama, junto con CuBr y 4,4'-dinoil-2,2'-dipiridilo como catalizador y ligando, respectivamente. El matraz de Schlenk se evacuó y relleno con argón a través de varios ciclos para eliminar el oxígeno. En un matraz separado, el estireno se desoxigenó mediante el burbujeo de argón a través de él durante al menos una hora, y luego se cargó en el matraz de Schlenk. Luego la mezcla se calentó a 115 °C durante tres horas y la solución del producto marrón se disolvió en THF, se filtró a través de una columna de alúmina básica y se precipitó dos veces en hexano. El precipitado se filtró y se secó al vacío.

La relación de alimentación de [monómero]/[iniciador] fue de 28. La composición de PS/PEO se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3 con composiciones de polímero PS-*b*-PEO modificadas (relación PS/PEO de aproximadamente 1,2, PS(2400)-*b*-PEG(2000), y relación PS/PEO de aproximadamente 3,0, PS(6000)-*b*-PEG(2000), Advanced Polymer Materials Inc) y una cantidad de polímero modificada para PS(6000)-*b*-PEG(2000) (10 mg).

Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen piranina (normalizados a una concentración de

piranina de 0,007 mM para PS(2400)-*b*-PEO(2000) y 0,002 mM para PS(6000)-*b*-PEO(2000)) se incubaron con soluciones de PBS que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0-0,5 mM) y soluciones de PBS que contenían amoníaco 0,2 mM, todas a pH 7,4 a temperatura ambiente. Después de 10 min, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 455 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 413 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última. La concentración de amoníaco de la solución que contiene amoníaco 0,2 mM en PBS se determinó mediante comparación con una curva de regresión lineal (curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia) derivada de las relaciones de intensidad de fluorescencia de los estándares de amoníaco.

Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana y que contienen piranina (relación PS/PEO de aproximadamente 1,2 y 3,0) fueron capaces de cuantificar amoníaco en tampón fosfato. Los resultados se muestran en la Figura 14 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Ejemplo 15: Cuantificación de fenilalanina con polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina en tampón.

Síntesis de polímero de PS(3700)-*b*-PEO(2000). PS(3700)-*b*-PEO(2000) se sintetizó como se describe en el Ejemplo 12.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana fluorescentes como se describe en el Ejemplo 3 con una composición de polímero PS-*b*-PEO modificada (relación PS/PEO aproximadamente 1,9, PS(3700)-*b*-PEO(2000)).

Cuantificación de fenilalanina. La fenilalanina amonio liasa comercial de Rhodotorula glutinis (número EC 4.3.1.5, grado I, actividad: 0,8-2,0 unidades/mg de proteína (1 unidad convierte 0,001 mmol de fenilalanina por minuto a pH 8,5 a 30 °C), Sigma-Aldrich Chemie GmbH) se purificó utilizando filtración centrífuga (corte de 30 kDa) ocho veces durante 2 min a 15 000 x g. La fenilalanina amonio liasa (0,013 mg/ml) se incubó con diferentes soluciones de fenilalanina (0-1,2 mM, para usar como curva estándar) y soluciones de análisis de fenilalanina (con una concentración nominal de 0,625 mM) en tris(hidroximetil)aminometano 5 mM a pH 8,5 a 300 mOsmol/kg durante 15 min a 30 °C. Posteriormente, se incubaron alícuotas de estas soluciones con polimerosomas que contienen piranina (estandarizadas a una concentración de piranina de 0,017 mM) en tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (pH final de la dispersión de 7,4) a 300 mOsmol/kg a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 455 nm (longitud de onda de excitación dependiente del pH) y la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm excitada a 413 nm (longitud de onda de excitación independiente del pH) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia. La relación de intensidad de fluorescencia se determinó al normalizar la primera intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la última. Utilizando una curva estándar de relación de intensidad de fluorescencia de fenilalanina, se determinaron las concentraciones de las soluciones de análisis de fenilalanina como $0,631 \pm 0,022$ mM (media y desviación estándar, n=3).

Los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina pueden medir la concentración de fenilalanina en un tampón después de la incubación con fenilalanina amonio liasa.

Ejemplo 16: Curva estándar basada en la relación de absorbancia de polimerosomas con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina a diferentes concentraciones de amoníaco en tampón fosfato.

Síntesis de polímero de PS(3700)-*b*-PEO(2000). PS(3700)-*b*-PEO(2000) se sintetizó como se describe en el Ejemplo 12.

Preparación de los polimerosomas. Se produjeron y purificaron polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana como se describe en el Ejemplo 3 con una composición de polímero PS-*b*-PEO modificada (relación PS/PEO aproximadamente 1,9, PS(3700)-*b*-PEO(2000)).

Cuantificación de amoníaco. Los polimerosomas que contienen piranina (normalizados a una concentración de piranina de 0,01 mM) se incubaron con soluciones de PBS a pH 7,4 que contenían diferentes concentraciones de amoníaco (0-0,5 mM) a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se midió la absorbancia en las longitudes de onda de absorbancia dependientes del pH, 450 nm y 405 nm, utilizando un espectrofotómetro. La relación de absorbancia se determinó al normalizar la primera absorbancia respecto a la última.

La relación de absorbancia de los polimerosomas de PS-*b*-PEO con gradiente de pH transmembrana que contienen piranina depende de la concentración de amoníaco en el tampón. Los resultados se muestran en la Figura 15 y se expresan como media y desviación estándar (n=3).

Referencias

- Agostoni y otros, *Advanced Functional Materials* 2016; 26:8357-8357.
- Aldred y otros, *J Autism Dev Disord.* 2003;33:93-97.
- Ando y otros, *Biopsychosoc Med.* 2017; 11:19.
- Baliga y otros *J Indian Soc Periodontol.* 2013; 17:461-465.
- 5 Barsotti, *The Journal of Pediatrics* 2001; 138:S11-S20.
- Blachier y otros, *Journal of Hepatology* 2013; 58:593-608.
- Bergmann y otros, *Pediatrics* 2014; 133:e1072-e1076.
- Chen y otros, *J Breath Res.* 2014; 8:036003.
- Davankov y Tsyurupa, *Reactive Polymers* 1990;13:27-42.
- 10 Goggs y otros, *Veterinary Clinical Pathology* 2008; 37:198-206.
- Haugen y otros, *International Journal of Andrology* 1998;21:105-108.
- Hibbard y otros, *Anal Chem* 2013; 85: 12158-12165.
- Kano y Fendler, *BBA Biomembranes* 1978; 509:289-299.
- Kim y otros, *International Journal of Andrology* 1998; 21: 29-33.
- 15 Krack y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 2008; 130:7315-7320.
- Lukkarinen y otros, *Metabolism* 2003; 52:935-938.
- Maalouf y otros, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 2:883-888.
- Matoori y Leroux, *ADDR* 2015; 90:55-68.
- Mook y otros, *Desalination* 2012; 285:1-13.
- 20 Mortimer y Mueller, *Chemie*, 12ª edición, Thieme, 2015
- Oncescu y otros, *Lab Chip* 2013; 13:3232-3238.
- Rose y otros, *Hepatology* 1999; 30:636-640.
- Seiden-Long y otros, *Clinical Biochemistry* 2014; 47:1116-1120.
- Strickler y otros, *Leuk Lymphoma* 2017; doi: 10.1080/10428194.2017.1352090.
- 25 van Spronsen y otros, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5:743-756
- Vilstrup y otros, *Hepatology* 2014; 60:715-735.

REIVINDICACIONES

1. Un polimerosoma que comprende (a) una membrana, que comprende un copolímero de bloques de poli(estireno) (PS) y óxido de polietileno (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0; y (b) un núcleo que contiene un ácido y al menos un tinte sensible al pH.
2. El polimerosoma de la reivindicación 1, en donde (a) el copolímero de bloques es un copolímero dibloque; y/o (b) el ácido y el al menos un tinte sensible al pH son moléculas diferentes o la misma molécula; y/o (c) en donde el ácido es un hidroxiácido, con la máxima preferencia un ácido cítrico; y/o (d) el tinte sensible al pH es un tinte fluorescente sensible al pH o un tinte de absorbancia sensible al pH.
3. El polimerosoma de la reivindicación 1 o 2, preparado mediante un método que comprende mezclar un solvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido y al menos un tinte sensible al pH, en donde el solvente orgánico es preferiblemente inmiscible en agua o parcialmente miscible en agua.
4. Un método para fabricar el polimerosoma definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
 - (a) disolver el copolímero de bloques de PS y PEO en un solvente orgánico, preferiblemente un solvente orgánico inmiscible en agua o parcialmente miscible en agua, para formar una fase orgánica que contiene el copolímero;
 - (b) mezclar la fase de solvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido y al menos un tinte sensible al pH para formar el polimerosoma; y
 - (c) eliminar el al menos un tinte sensible al pH no encapsulado y el solvente orgánico.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la fase acuosa comprende entre 0,2 y 100 mM de ácido.
6. Un polimerosoma preparado por el método definido en la reivindicación 4 o 5.
7. El polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, cuyo núcleo contiene además amoníaco.
8. Una composición que comprende el polimerosoma definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, y al menos un excipiente, preferiblemente en donde (i) el al menos un excipiente comprende un conservante, un crioprotector, un lioprotector, un antioxidante, o una combinación de al menos dos de los mismos; y/o (ii) la composición está en forma líquida o sólida.
9. Una tira que comprende la composición definida en la reivindicación 8, en forma sólida.
10. Uso de un polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, o la composición de la reivindicación 8, o la tira de la reivindicación 9, para la cuantificación in vitro de amoníaco en una muestra de fluido.
11. El uso de la reivindicación 10, en donde la muestra comprende un fluido corporal de un sujeto; y preferiblemente la muestra comprende además un tampón.
12. El uso de la reivindicación 11, en donde el sujeto (i) tiene una enfermedad o trastorno asociado con el amoníaco o fenilcetonuria; (ii) se sospecha que tiene o es un candidato probable para tener una enfermedad o trastorno asociado con el amoníaco o fenilcetonuria; o (iii) está siendo sometido a un tratamiento antihiperamonémico o antifenilcetonúrico.
13. Un método, para determinar in vitro la concentración de amoníaco en una muestra, que comprende:
 - (a) poner en contacto el polimerosoma definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, la composición de la reivindicación 8 o la tira de la reivindicación 9, con la muestra;
 - (b) determinar al menos una propiedad espectroscópica dependiente del pH en la muestra que contiene el polimerosoma o la composición o en la tira que contiene la muestra; y
 - (c) determinar la concentración de amoníaco en la muestra utilizando la al menos una propiedad espectroscópica dependiente del pH al referirse a una curva estándar.
14. El método de la reivindicación 13, en donde:
 - (A)
 - (i) la propiedad espectroscópica dependiente del pH es una absorbancia dependiente del pH, el tinte sensible al pH es un tinte de absorbancia dependiente del pH y la curva estándar es una curva estándar de absorbancia; o
 - (ii) la propiedad espectroscópica dependiente del pH es una intensidad de fluorescencia dependiente del pH, el tinte sensible al pH es un tinte fluorescente sensible al pH y la curva estándar es una curva

estándar de fluorescencia; o

(iii) (b) comprende además determinar al menos una propiedad espectroscópica independiente del pH o al menos una propiedad espectroscópica dependiente del pH adicional en la muestra que contiene el polimerosoma o la composición o en la tira que contiene la muestra para calcular al menos una relación de propiedades espectroscópicas, y en donde (c) determina la concentración de amoníaco en la muestra que contiene el polimerosoma o la composición o en la tira que contiene la muestra utilizando al menos una relación de propiedades espectroscópicas dependiente del pH al referirse a una curva estándar de relación de propiedades espectroscópicas, preferiblemente en donde:

- la al menos una propiedad espectroscópica dependiente del pH y la al menos una propiedad espectroscópica independiente del pH son producidas por el mismo tinte sensible al pH; y/o
- la propiedad espectroscópica es absorbancia, y el tinte sensible al pH es un tinte de absorbancia sensible al pH o la propiedad espectroscópica es fluorescencia, y el tinte sensible al pH es un tinte fluorescente sensible al pH,

y/o

(B) la muestra comprende una muestra de fluido corporal de un sujeto, preferiblemente en donde el fluido corporal es una muestra de sangre o fracción de sangre, una muestra de saliva o una muestra de semen; con la máxima preferencia en donde el fluido corporal se ha tratado previamente con fenilalanina amonio liasa, y ventajosamente el método es para (i) diagnosticar in vitro una enfermedad o trastorno asociado con el amoníaco o fenilcetonuria en el sujeto, en donde una concentración de amoníaco en la muestra que es mayor que una concentración de amoníaco de referencia es una indicación de que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno asociado con el amoníaco o fenilcetonuria; o para (ii) monitorear in vitro la eficiencia de un tratamiento antihiperamonémico o antifenilcetonúrico, en donde una concentración de amoníaco en la muestra que es menor que una concentración de amoníaco de referencia es una indicación de que el tratamiento antihiperamonémico o antifenilcetonúrico es eficaz.

15. Un kit para determinar la concentración de amoníaco en una muestra que comprende (a) el polimerosoma definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, la composición definida en la reivindicación 9 o la tira de la reivindicación 9, y (b) (i) una solución para hidratar el polimerosoma; (ii) un tampón para ajustar el pH de la fase exterior del polimerosoma y/o de la muestra a analizar; (iii) un diluyente para diluir la muestra a analizar; (iv) una curva estándar de fluorescencia y/o una curva estándar de absorbancia; (v) una o varias soluciones de concentración de amoníaco conocida; o (vi) una combinación de al menos dos de (i) a (v).

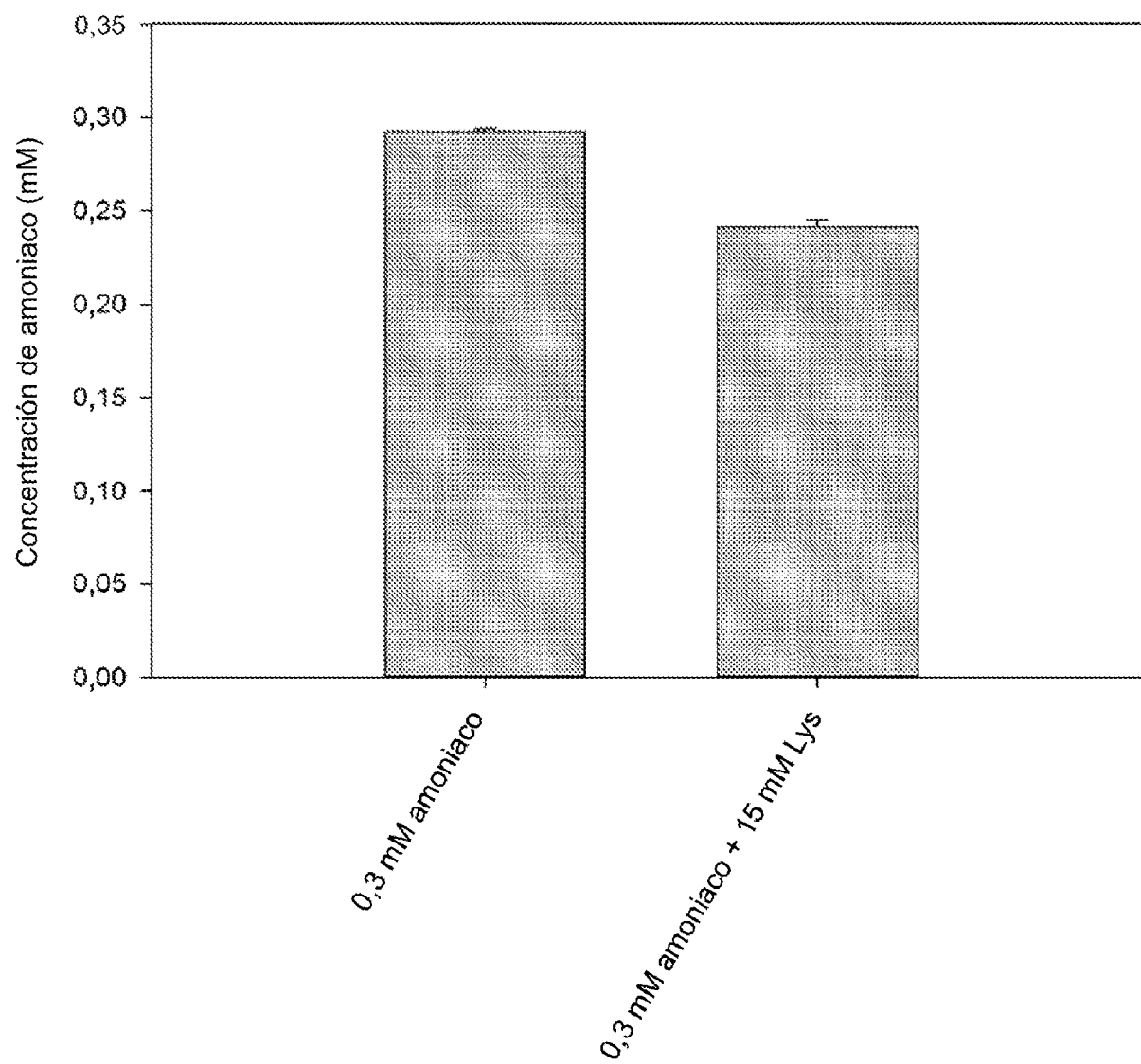


FIGURA 1

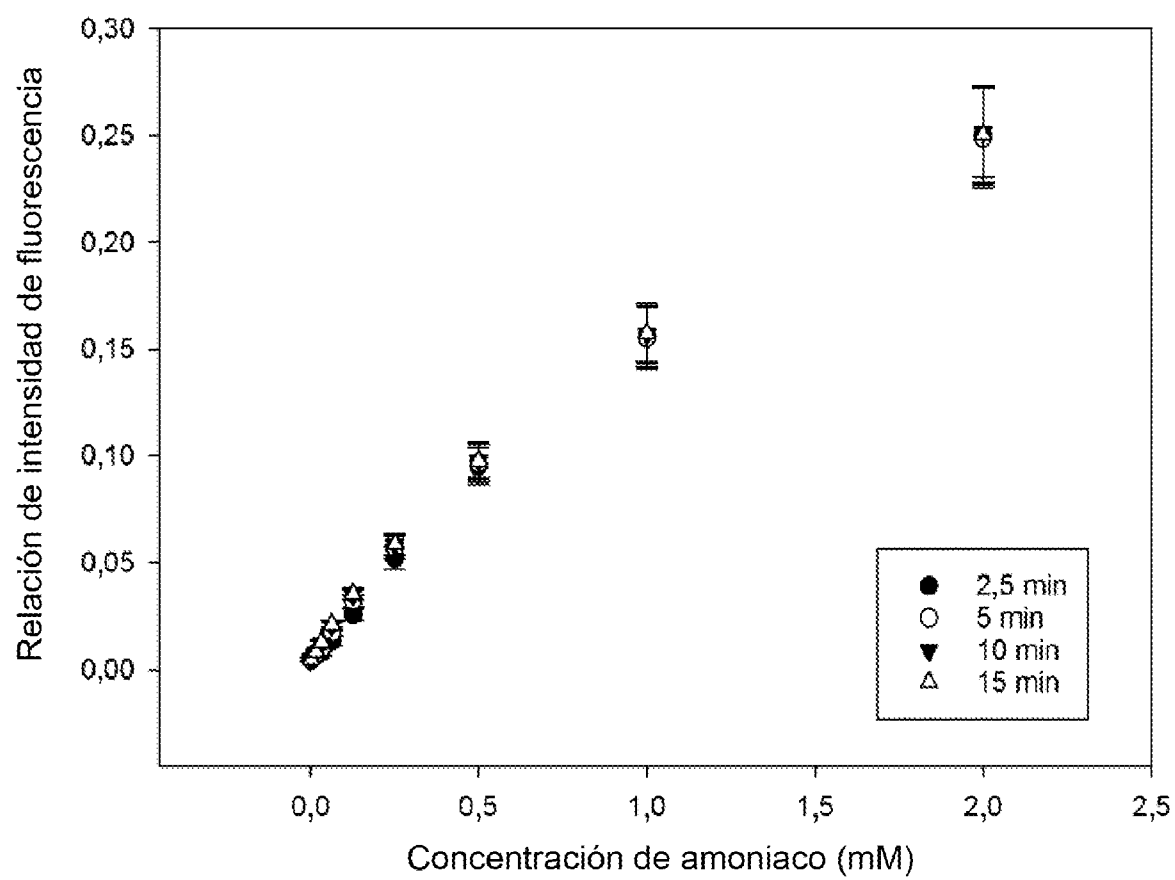


FIGURA 2

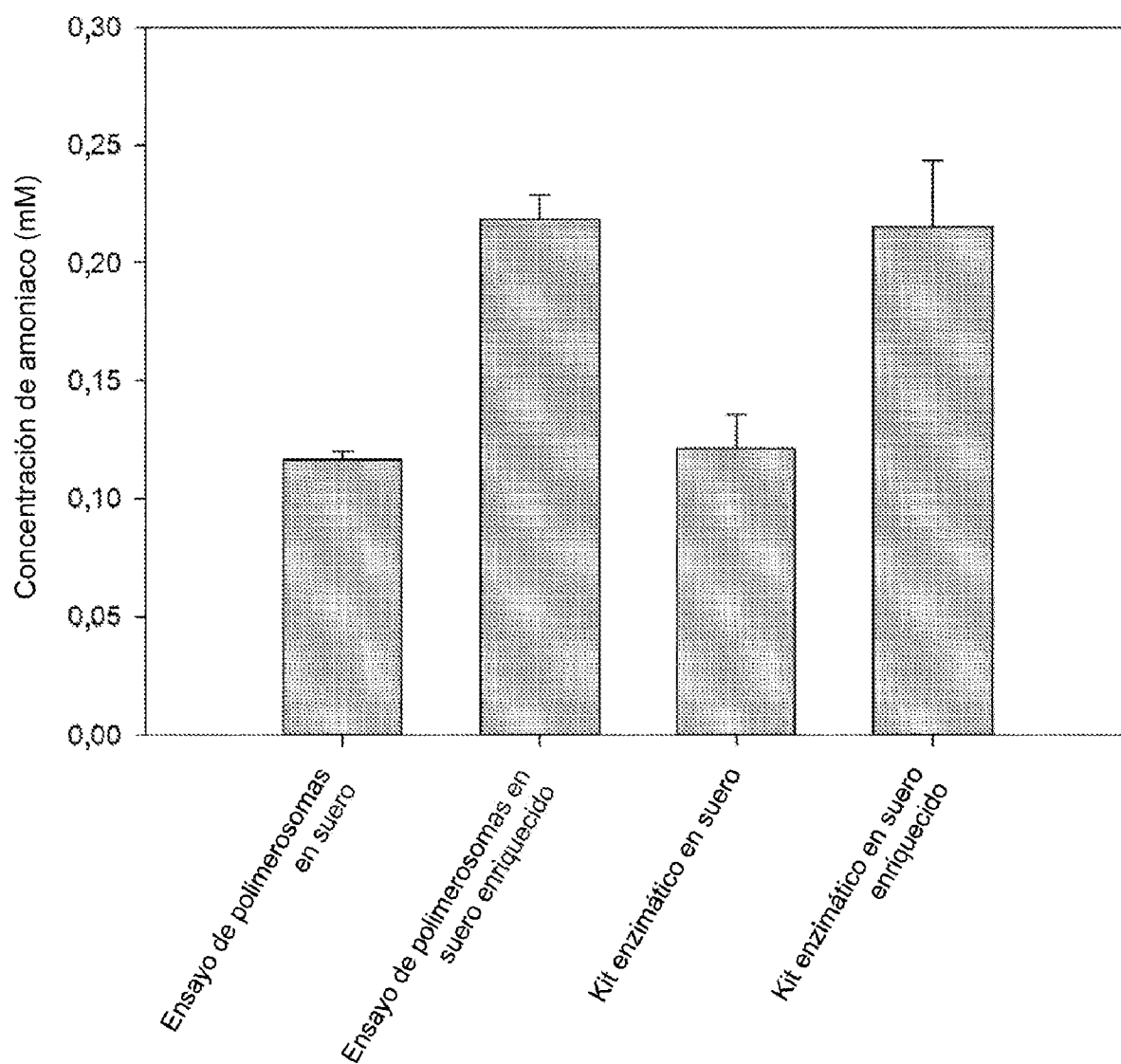


FIGURA 3

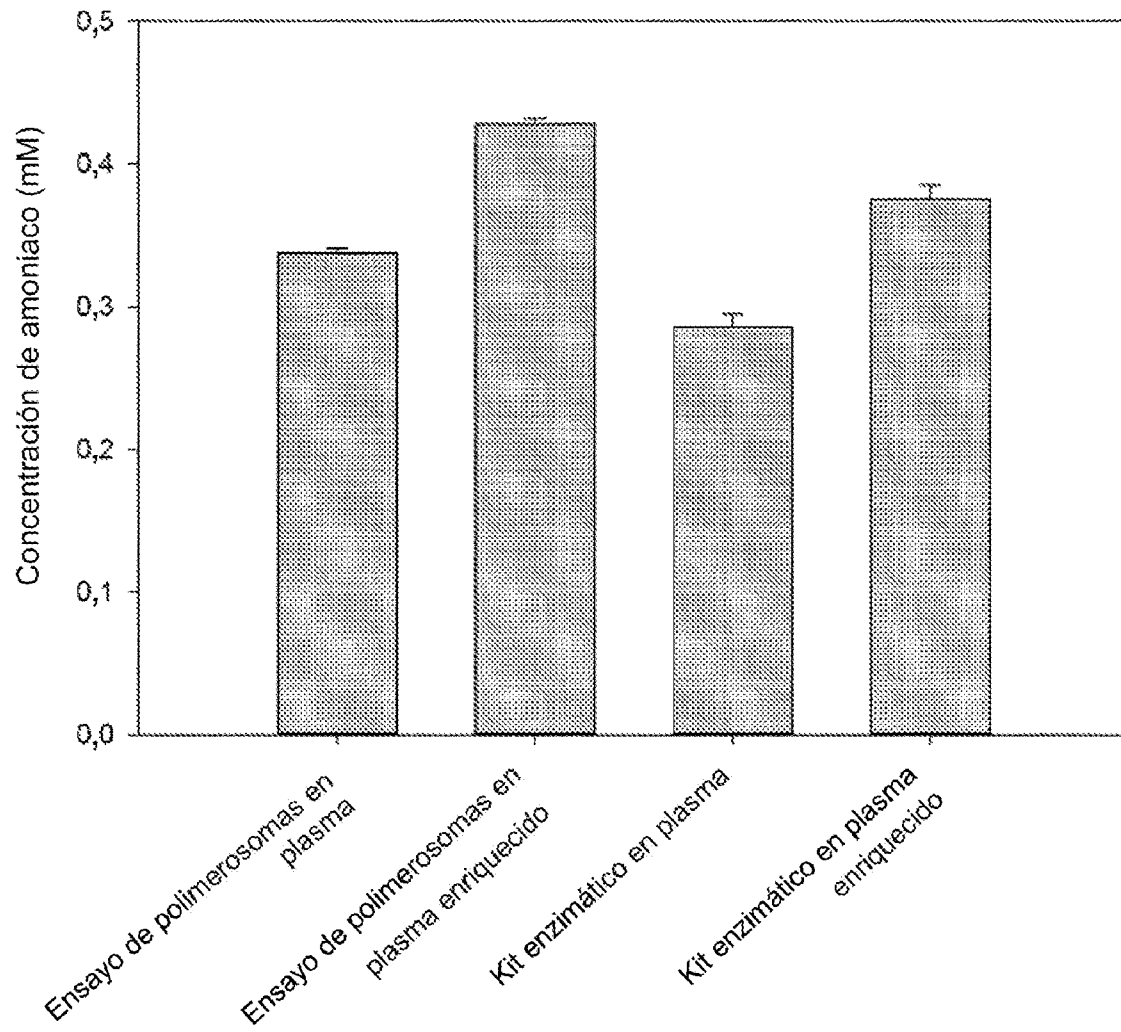


FIGURA 4

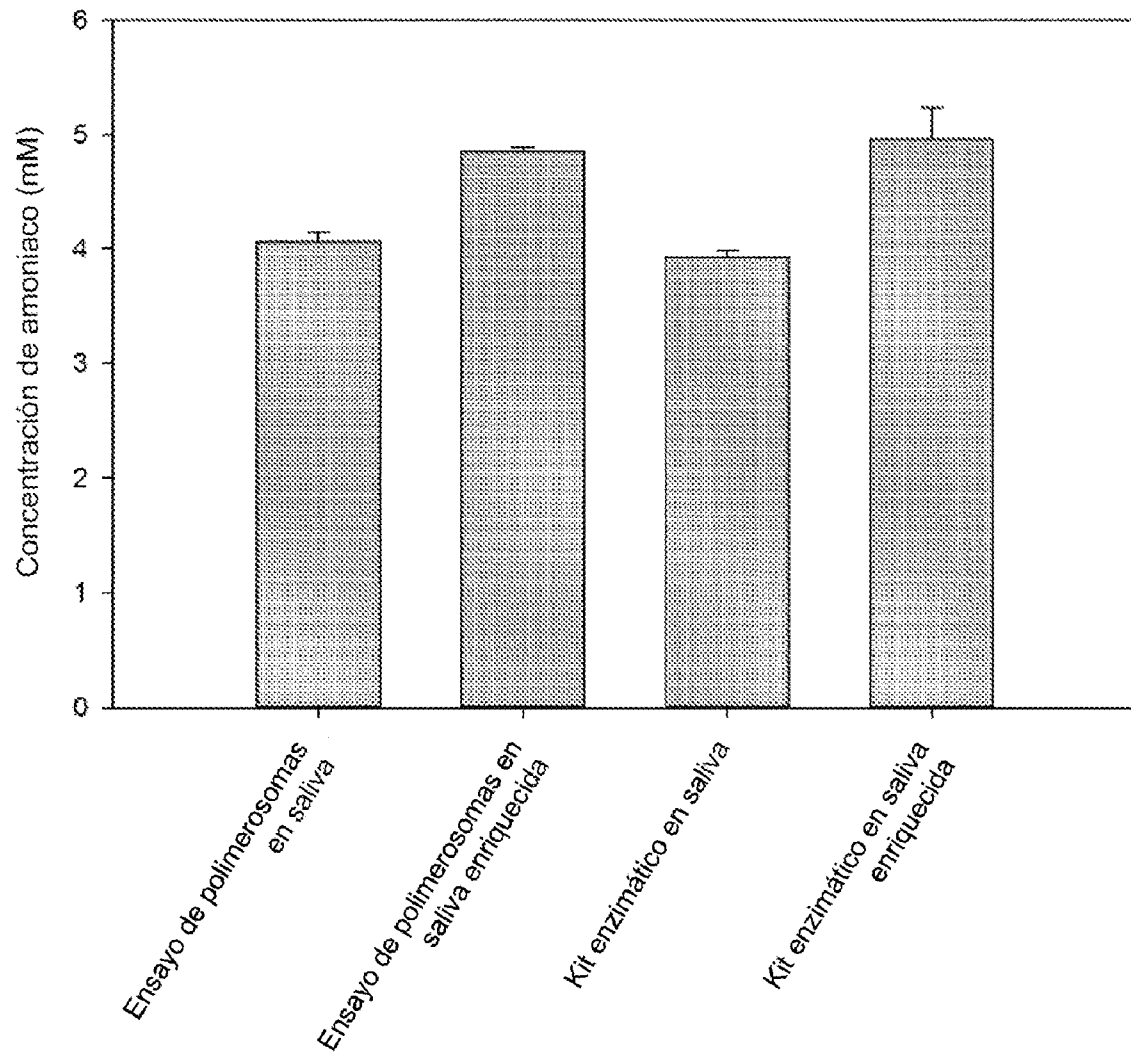


FIGURA 5

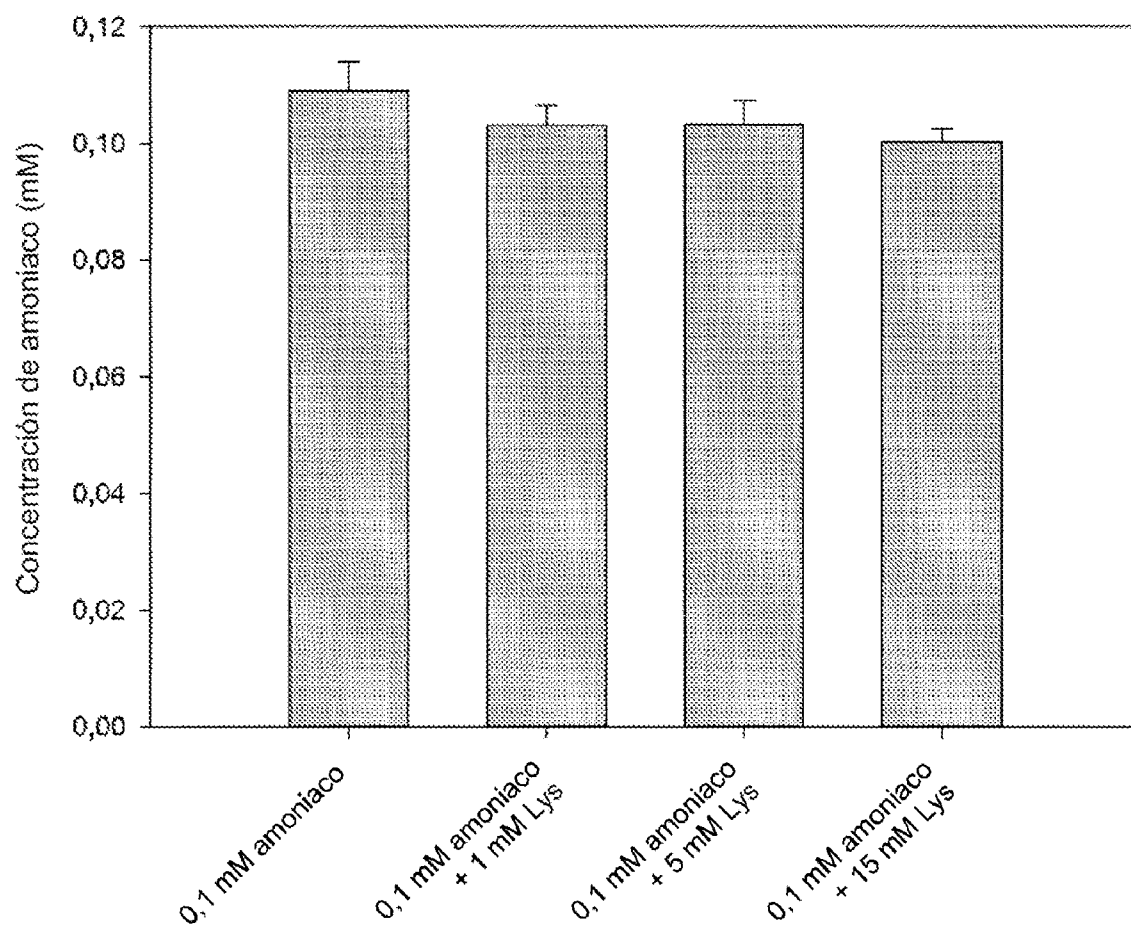


FIGURA 6

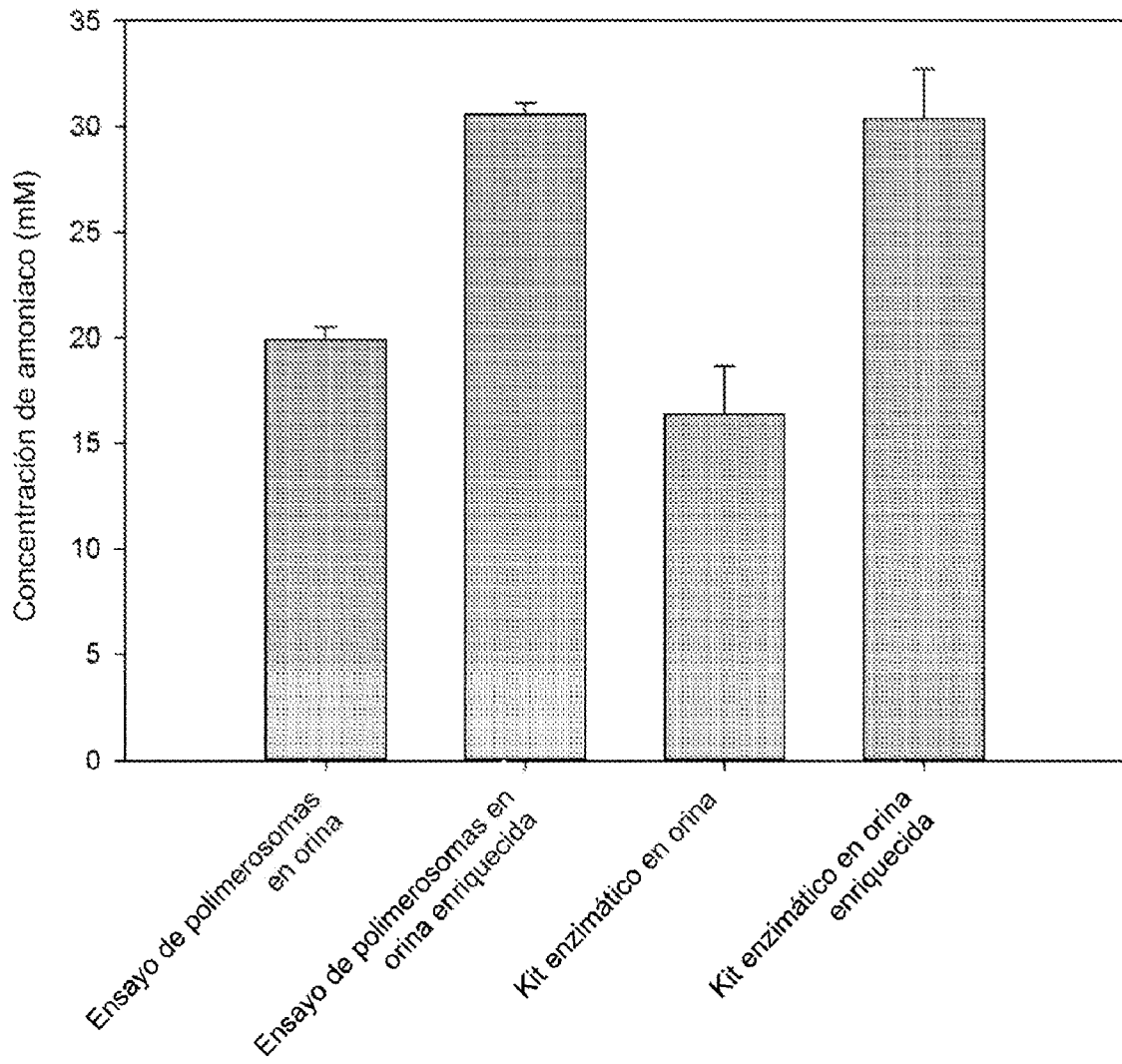


FIGURA 7

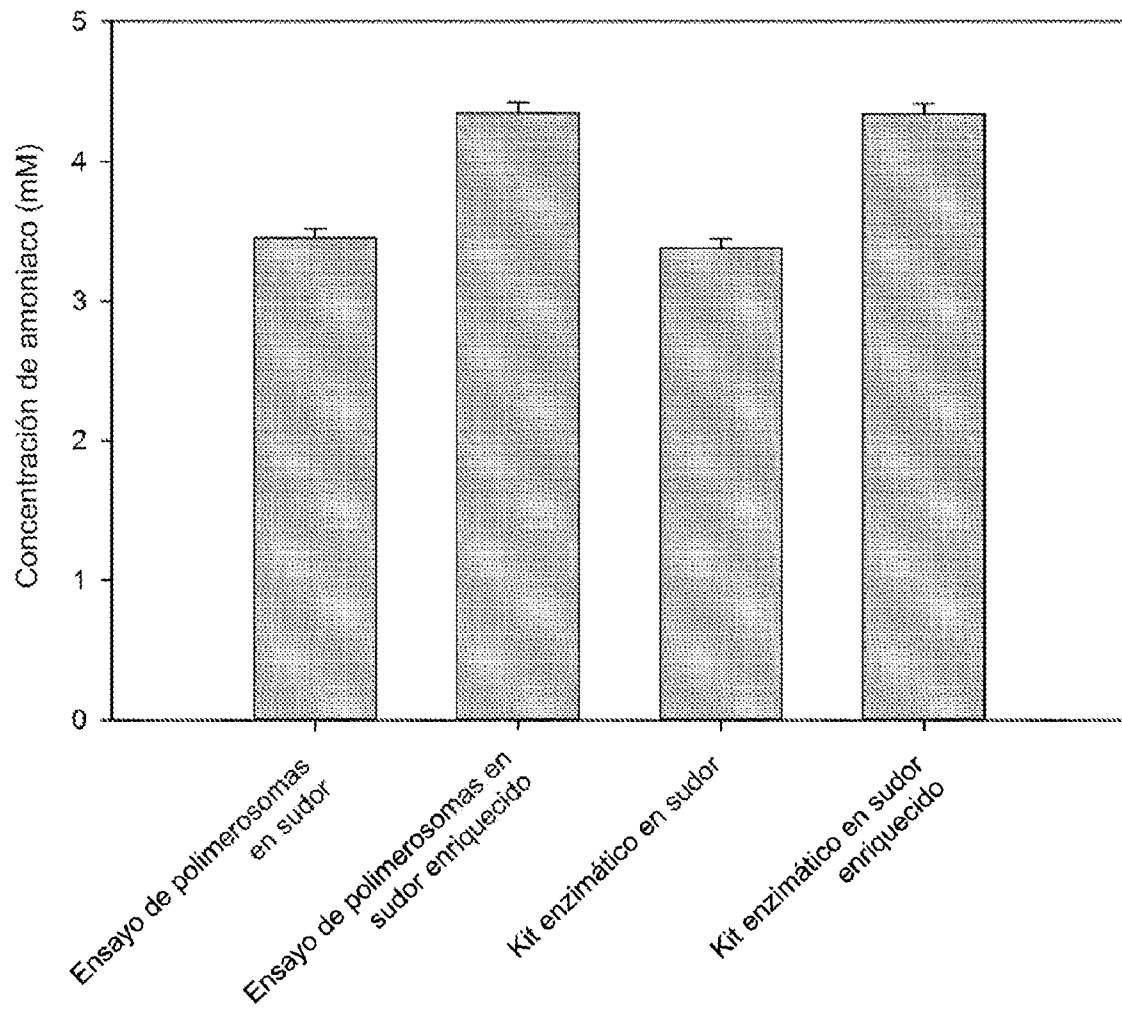


FIGURA 8

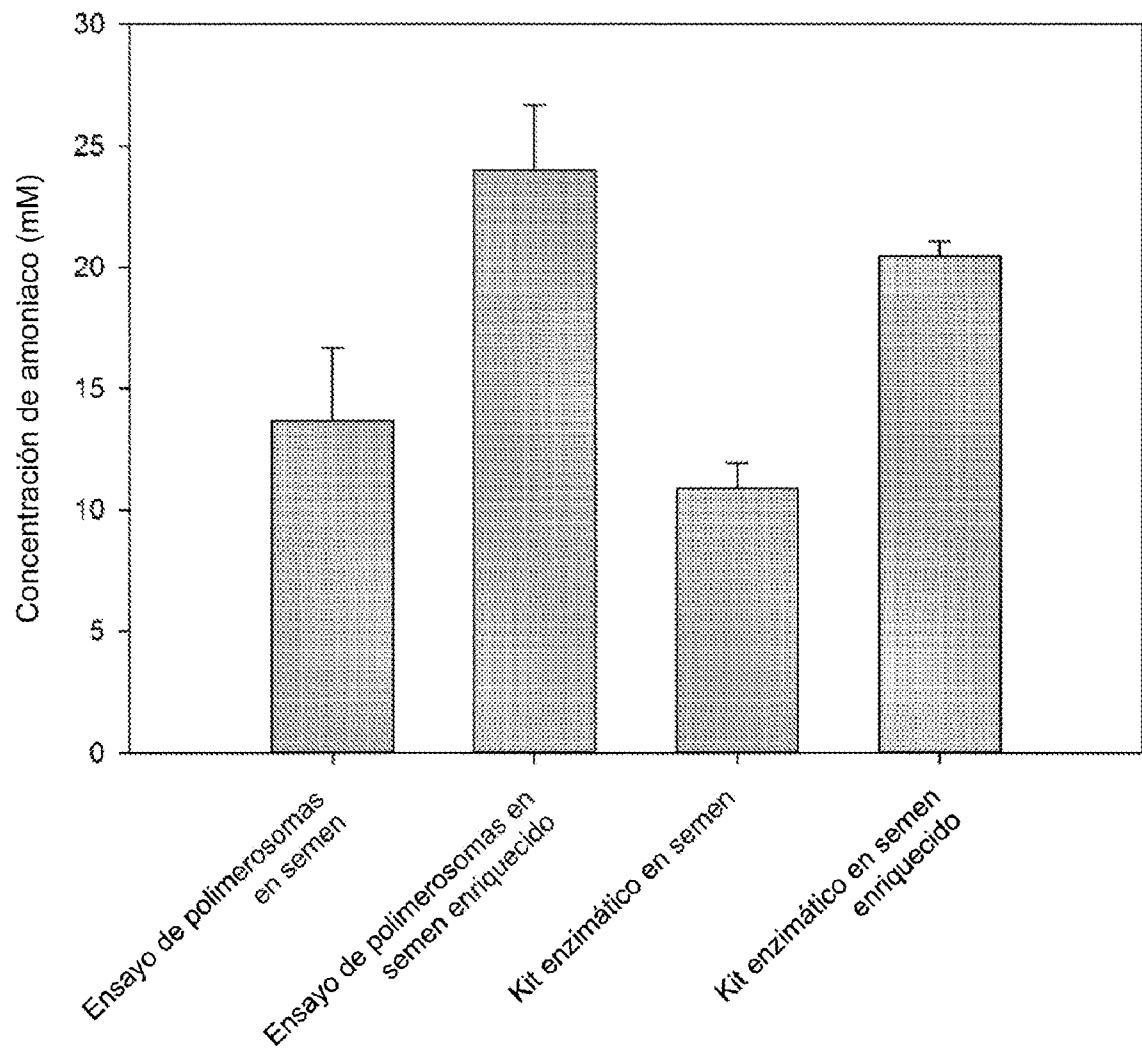


FIGURA 9

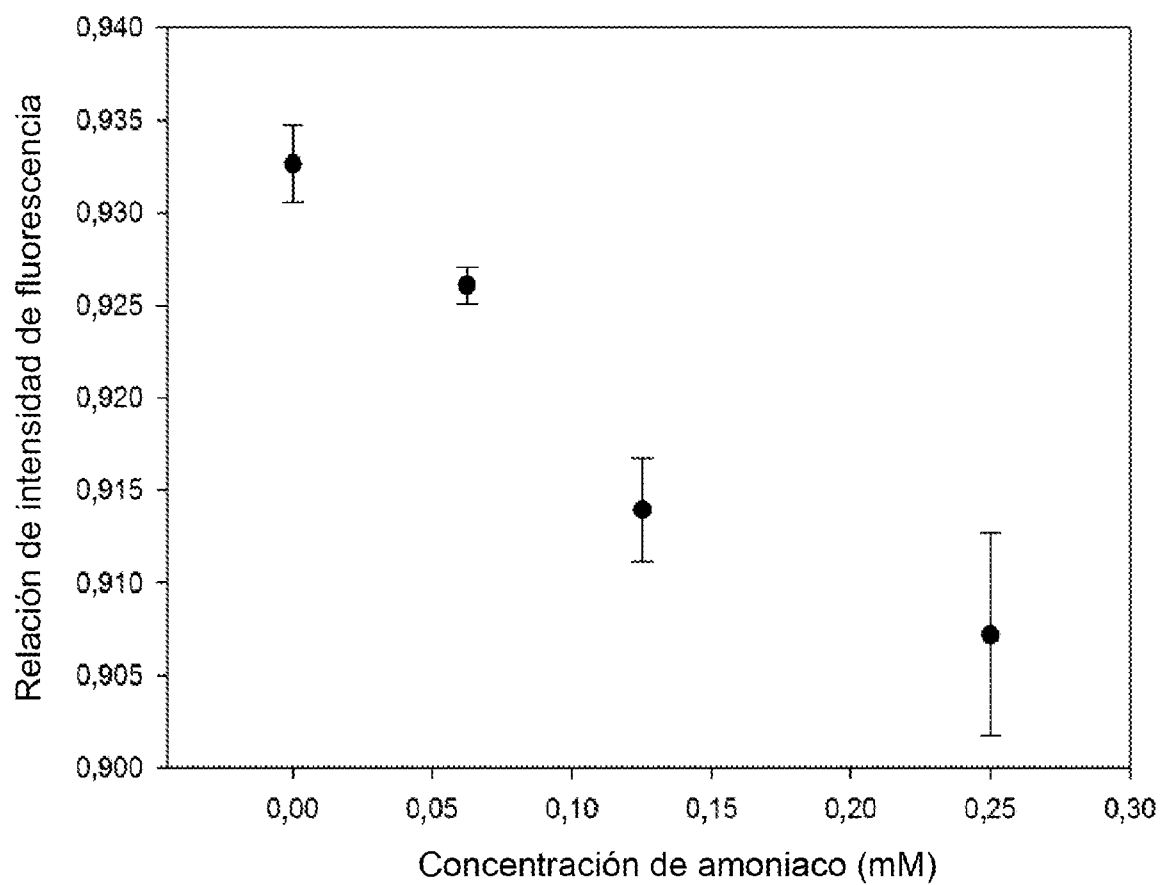


FIGURA 10

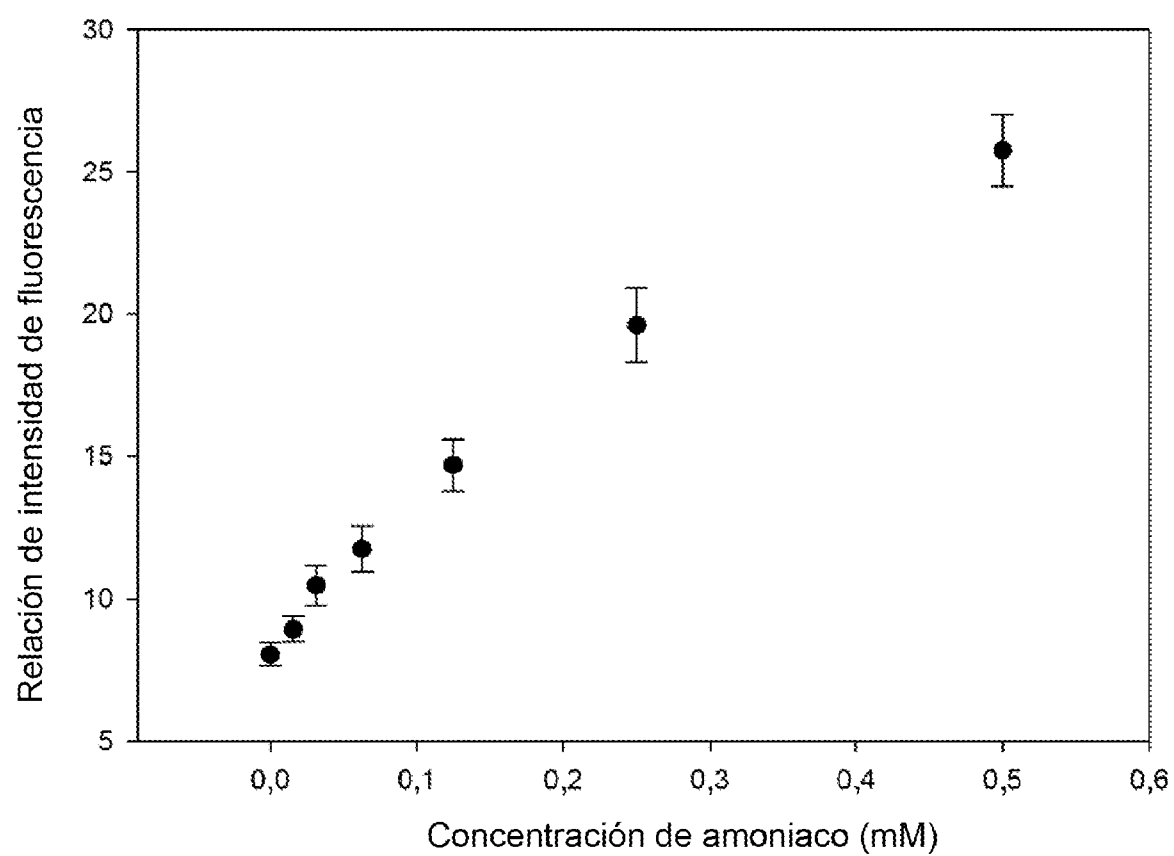


FIGURA 11

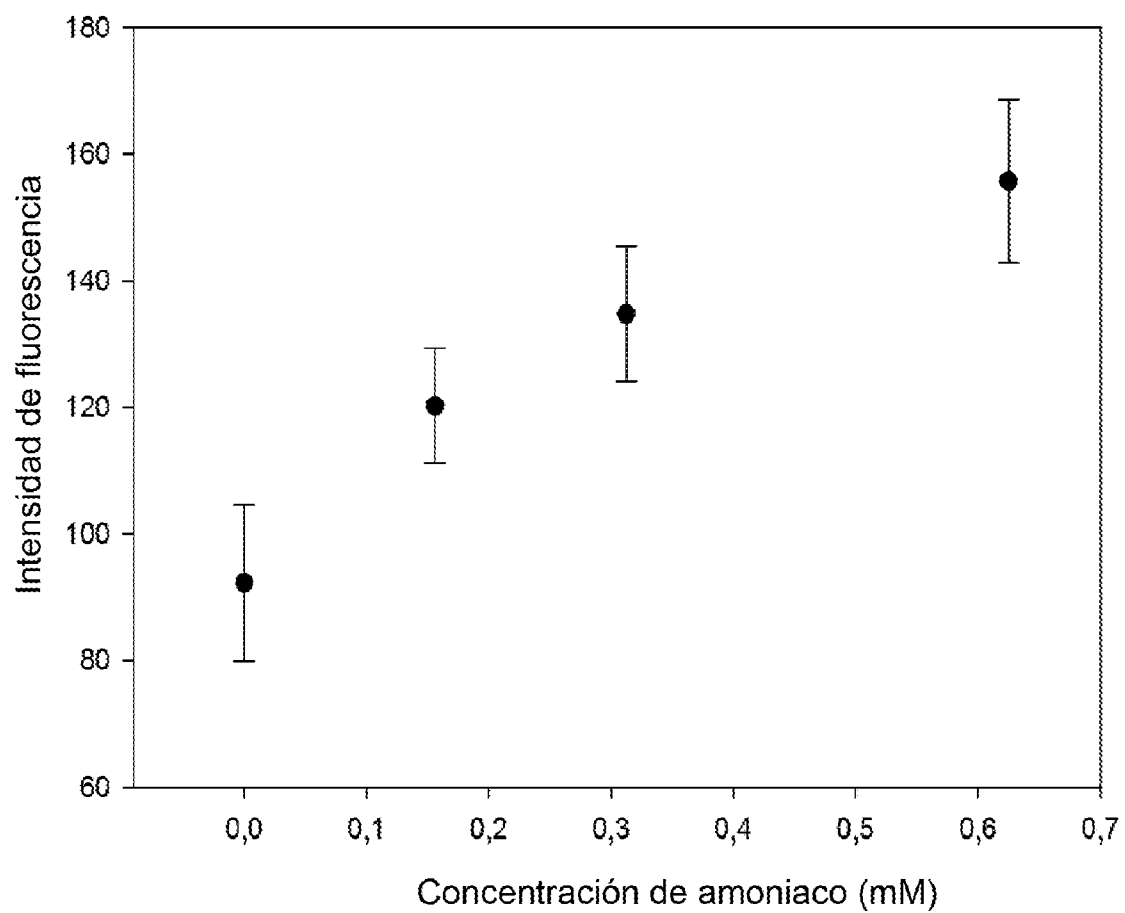


FIGURA 12

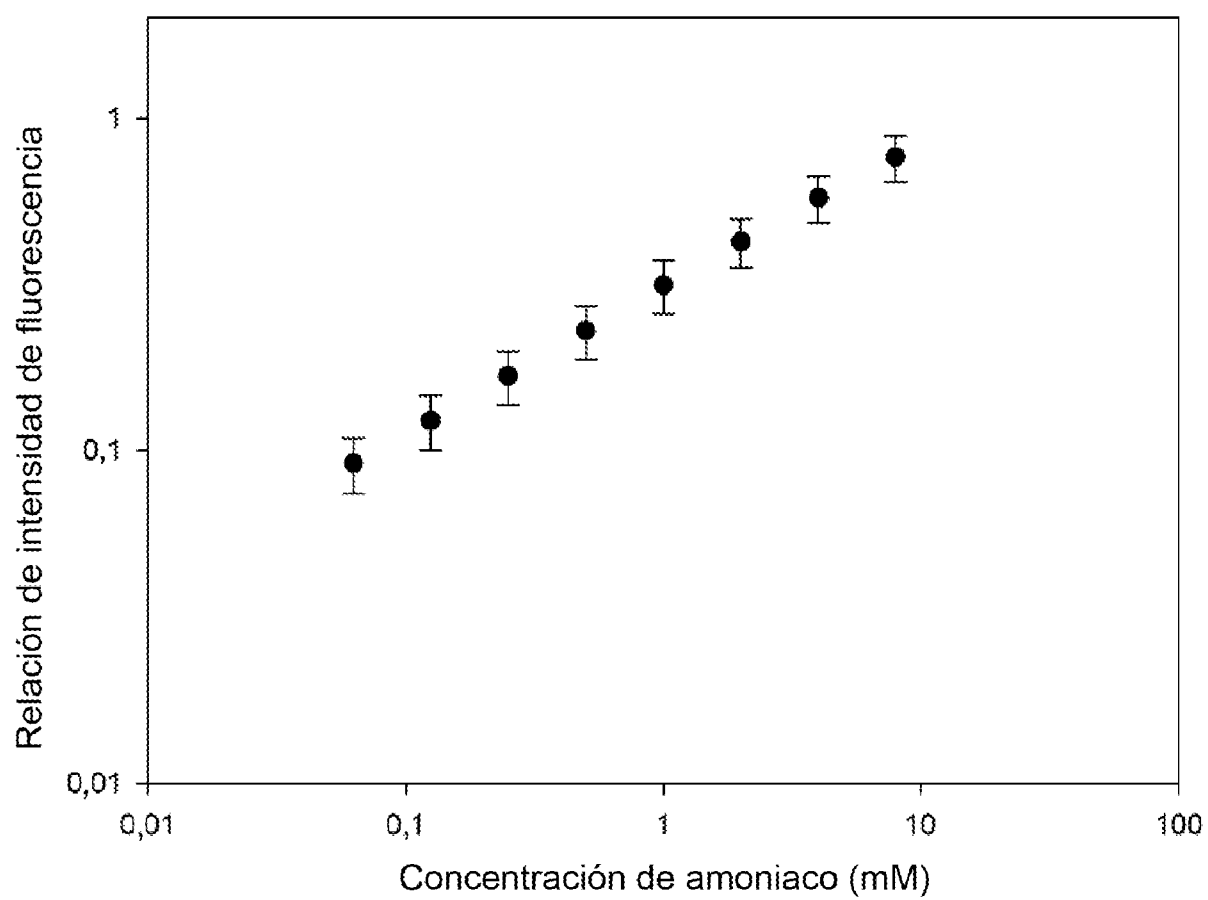


FIGURA 13

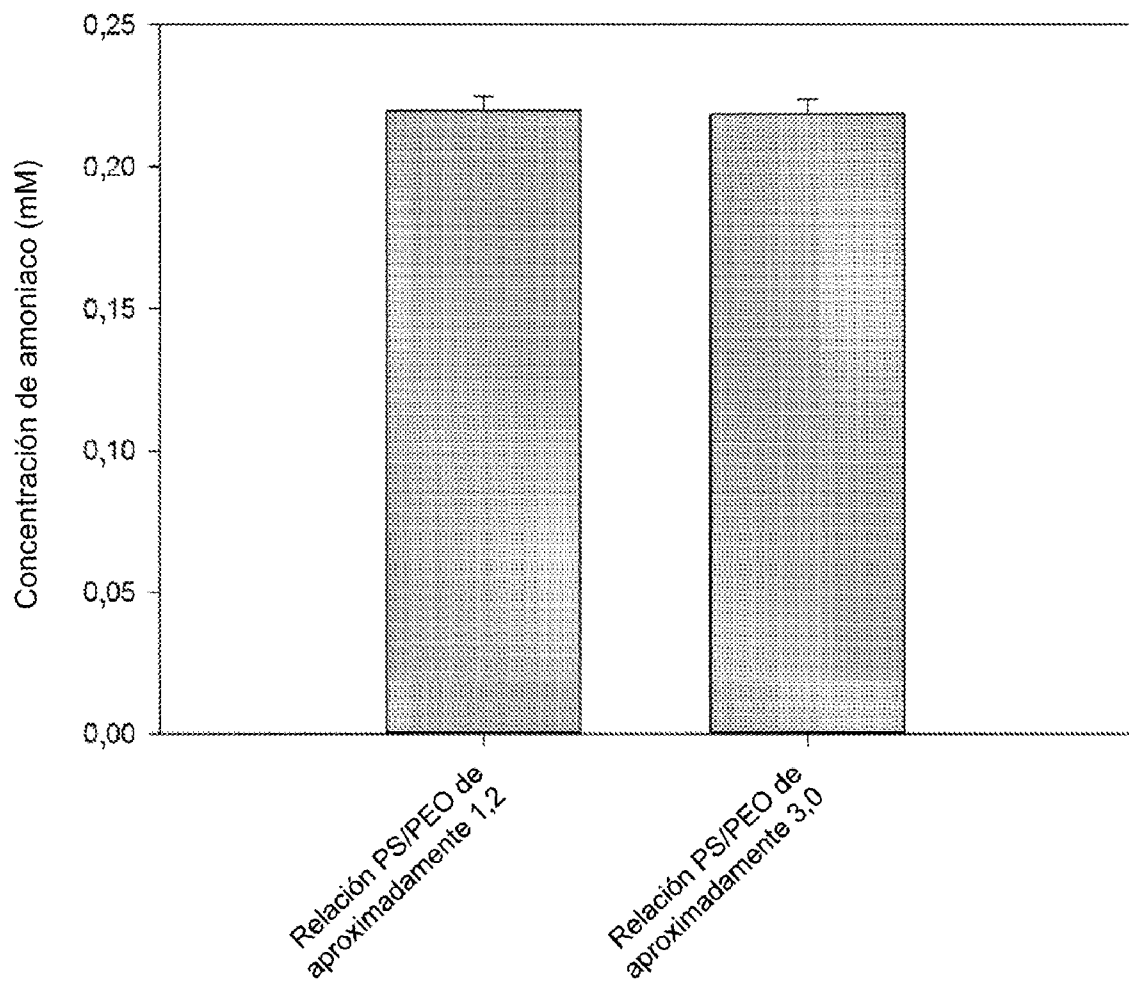


FIGURA 14

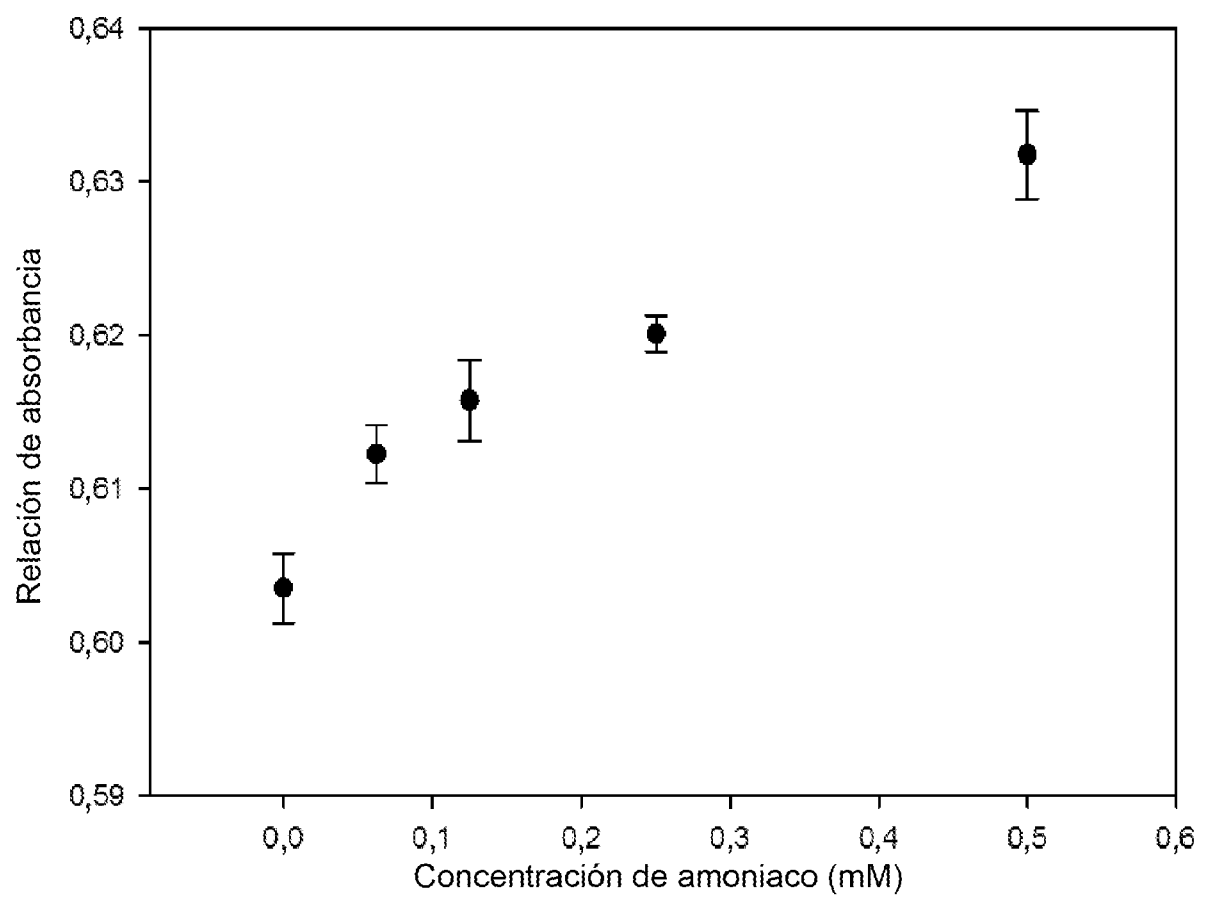


FIGURA 15